

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25. 3. 2004

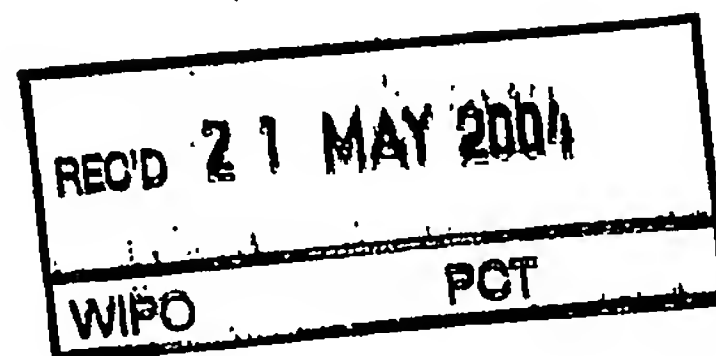
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 8月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願 2003-207738
[ST. 10/C]: [JP 2003-207738]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社 エフェクター細胞研究所

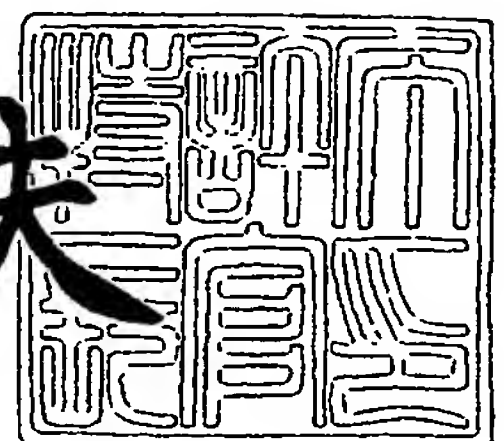


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 MS15092000

【提出日】 平成15年 8月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G02B 21/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区駒場 4 - 2 - 3 - 2 1 1

 【氏名】 金ヶ崎 士朗

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都八王子市石川町 2 9 5 1

 【氏名】 林 真市

【特許出願人】

 【識別番号】 500201406

 【氏名又は名称】 株式会社エフエクター細胞研究所

【代理人】

 【識別番号】 100084032

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 三品 岩男

 【電話番号】 045(316)3711

【選任した代理人】

 【識別番号】 100104570

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 大関 光弘

 【電話番号】 045(316)3711

【選任した代理人】

 【識別番号】 100102820

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西村 雅子

 【電話番号】 045(316)3711

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 88929

【出願日】 平成15年 3月27日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011992

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 観察器具及びそれを用いた観察方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミラーを有する観察対象物収納部を備えた観察器具。

【請求項 2】

対物レンズを有する光学系を介して落射照明光により照明して観察対象物を観察する観察方法において用いられる観察対象物収納用の観察器具であって、

観察時に前記落射照明光を反射する反射面が設けられていることを特徴とする観察器具。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の観察器具であって、

前記反射面は、観察時に対物レンズに対向することになる面に設けられていることを特徴とする観察器具。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の観察器具であって、

前記反射面は、観察時に対物レンズに対向することになる面の反対面に設けられていることを特徴とする観察器具。

【請求項 5】

請求項 2 ～ 4 のいずれか一項に記載の観察器具であって、

前記観察対象物が通過する流路が設けられていることを特徴とする観察器具。

【請求項 6】

請求項 2 ～ 5 のいずれか一項に記載の観察器具であって、

前記観察対象物を収納する収納部に、観察対象物を含む液体を注入する口と、流出させる口とを備えていることを特徴とする観察器具。

【請求項 7】

対物レンズを有する光学系を介して落射照明光により照明して観察対象物を観察する観察方法であって、

前記観察対象物を収納する観察器具には、観察時に前記落射照明光を反射する

反射面が設けられており、

前記観察器具に観察対象物を収納し、前記観察対象物を観察する、ことを特徴とする観察方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の観察方法であって、

前記反射面は、観察時に対物レンズに対向することになる面に設けられていることを特徴とする観察方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の観察方法であって、

前記反射面は、観察時に対物レンズに対向することになる面の反対面に設けられている

ことを特徴とする観察方法。

【請求項 1 0】

請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の観察方法であって

前記観察対象物は、微小透明体であることを特徴とする観察方法。

【請求項 1 1】

請求項 7 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の観察方法であって、

前記観察器具は、液体を保持できる容器を有し、

前記容器に、観察対象物を内包する液体とともに収納する、ことを特徴とする観察方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の観察方法であって、

前記観察対象物は、細胞であり、

前記液体は、培養液である、ことを特徴とする観察方法。

【請求項 1 3】

請求項 7 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の観察方法であって、

前記観察対象物と前記反射面との距離が、前記光学系の焦点深度の半分以下になるように、前記観察対象物を前記観察器具に収納することを特徴とする観察方法。

【請求項 1 4】

請求項 7 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の観察方法であって、

前記観察対象物と前記反射面との距離 d が下記式 (1)

$$d \leq W / (2 NA^2) \quad \dots (1)$$

(式中、 d は観察対象物と反射面との距離を表し、 W は観察に用いる光の波長を表し、 NA は光学系の開口数を表す。)

を満たすように、前記観察対象物を前記観察器具に収納する、
ことを特徴とする観察方法。

【請求項 1 5】

請求項 7 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の観察方法であって、

前記観察対象物に対する照明光の開口数が、対物レンズの開口数より小さくなるように、前記観察対象物を前記観察器具に収納する、
ことを特徴とする観察方法。

【請求項 1 6】

請求項 7 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の観察方法であって、

前記観察対象物と前記反射面との距離 d が下記式 (2)

$$d > F / (4 \tan(\sin^{-1} NA)) \quad \dots (2)$$

(式中、 d は観察対象物と反射面との距離を表し、 F は光学系の視野径を表し、 NA は光学系の開口数を表す。)

を満たすように、前記観察対象物を前記観察器具に収納する、
ことを特徴とする観察方法。

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****【技術分野】**

本発明は物体の観察技術、特に細胞等の透明な微小物体の観察技術に関する。

【0 0 0 2】**【従来の技術】**

従来、細胞等の微小透明物体の観察には、透過観察顕微鏡を用いていた。そして、無染色の生きた細胞の内部構造や形態を高コントラストで観察するためには

、位相差顕微鏡、レリーフ位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、偏光顕微鏡など、位相差リングを持つ特殊なコンデンサーや微分干渉プリズムなどと共に特殊なレンズを備えた顕微鏡を使用することが必要であった。

【0003】

具体的には、培養液中の細胞など、透明な微小物体を顕微鏡観察する方法として、位相差法や偏斜照明法、微分干渉法等に代表される特殊観察法が広く用いられている（特許文献1等参照）。特殊観察法の光学系の構成は、図16に示すように、照明光を発生するための光源713と、光源713から発した照明光の進行方向をそろえるためのコリメートレンズ741と、進行方向がそろった照明光の進行方向を垂直方向に偏向するための反射鏡742と、照明光を集光するための窓レンズ743と、集光した照明光を観察する物体を含む標本708に照射するためのコンデンサレンズ744と、標本708を拡大投影する為の対物レンズ706と、標本708の像を像面745上に結像する為の結像レンズ746と、標本708の観察位置を調整する為のステージ717とからなる通常の透過明視野観察の構成に対して、コンデンサレンズ744の入射瞳位置に照明変調素子747を、対物レンズ706の射出瞳位置に結像変調素子748を加えたものである。照明変調素子747にリングスリットを、結像変調素子748に位相板を用いたものが、位相差法であり、照明変調素子747に偏心開口を用いたものが、偏斜照明法であり、照明変調素子747と結像照明素子748両方に、偏光板と微分干渉プリズムを用いたものが、微分干渉法である。特殊観察法を用いることにより、周りの媒質と屈折率が異なれば、透明な物体でも明暗のコントラストをつけて観察することができるようになる。このような特殊観察法は特に、本来透明であり、そのままではなかなか見えにくい生体組織を、コントラスト良く観察する為に有効である。

【特許文献1】

特開平7-225341号公報

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、これら特殊観察方法では、前述の通りコンデンサレンズ744や対物

レンズ 7 0 6 の瞳位置に、特殊な変調素子を配置しなければならない。これら特殊な変調素子は、非常に高価であると同時に、たとえば対物レンズ 7 0 6 の倍率変換時にその変調素子も切り替える必要が生じる等、使用面でも不便なことが多い。

【 0 0 0 5 】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、透明な微小物体を、特殊観察法に必要とされるような特殊な変調素子を用いることなく、かつ簡便に観察することを可能とする技術を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明の観察器具は、ミラー（反射面）を有する観察対象物収納部を備えた観察器具である。また、対物レンズを有する光学系を介して落射照明光により照明して観察対象物を観察する観察方法において用いられる観察対象物収納用の観察器具であって、観察時に前記落射照明光を反射する反射面が設けられている。

【 0 0 0 7 】

前記反射面は、観察時に前記対物レンズに対向することになる面に設けられていてもよく、前記対物レンズに対抗することになる面の反対面に設けられてもよい。

【 0 0 0 8 】

また、前記観察対象物が通過する流路が形成されていてもよい。また、前記観察対象物を収納する収納部に、観察対象物を含む液体を注入する口と、流出させる口とを備えていてもよい。

【 0 0 0 9 】

また、本発明の観察方法は、対物レンズを有する光学系を介して落射照明光により照明して観察対象物を観察する観察方法であって、前記観察対象物を収納する観察器具には、観察時に前記落射照明光を反射する反射面が設けられており、前記観察器具に観察対象物を収納し、前記観察対象物を観察することを特徴とする。

【 0 0 1 0 】

前記反射面は、観察時に前記対物レンズに対向することになる面に設けられていてもよく、前記対物レンズに対抗することになる面の反対面に設けられていてもよい。

【0011】

また、前記観察対象物は、微小透明体であってもよい。

【0012】

また、前記観察器具は、液体を保持できる容器を有し、前記容器に、観察対象物を内包する液体とともに収納するようにしてもよい。ここで、前記観察対象物は、細胞であり、前記液体は、培養液であってもよい。

【0013】

また、前記観察対象物と前記反射面との距離が、前記光学系の焦点深度の半分以下になるように、前記観察対象物を前記観察器具に収納するようにしてもよい。

【0014】

具体的には、前記観察対象物と前記反射面との距離 d が下記式 (1)

$$d \leq W / (2 NA^2) \quad \dots (1)$$

(式中、 d は観察対象物と反射面との距離を表し、 W は観察に用いる光の波長を表し、 NA は光学系の開口数を表す。)

を満たすように、前記観察対象物を前記観察器具に収納するようにしてもよい。

【0015】

さらに、前記観察対象物に対する照明光の開口数が、対物レンズの開口数より小さくなるように、前記観察対象物を前記観察器具に収納するようにしてもよい。

【0016】

具体的には、前記観察対象物と前記反射面との距離 d が下記式 (2)

$$d > F / (4 \tan(\sin^{-1} NA)) \quad \dots (2)$$

(式中、 d は観察対象物と反射面との距離を表し、 F は光学系の視野径を表し、 NA は光学系の開口数を表す。)

を満たすように、前記観察対象物を前記観察器具に収納するようにしてもよい。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明の一実施形態について、図面を参照して説明する。まず、本発明を適用した第1実施形態にかかる観察器具について説明する。

【0018】

本発明の観察器具は、顕微鏡を用いて細胞等を反射光で観察乃至検出するための器具であり、細胞等を収納する部分、即ち観察対象物収納部を備えるものである。そして、少なくとも、この観察器具が観察する波長域の光を反射する面、即ち、ミラー面（反射面）を形成する面を有する。

【0019】

本発明に関わる観察器具の構造の一例を図1～図6に示す。なお、図中、矢印Xは、対物レンズにより、X方向から観察対象物を観察することを示す。

【0020】

図1（A）に示す観察器具において、1はガラス、プラスチック、金属、シリコンウエハ等から構成される構造体であり、2が細胞等の観察対象物を収納する窪みである。収納部2の底面3には、観察する波長域の光を反射するミラーが設けられている。反射面を構成するミラーとしては、ガラス、プラスチック、金属等に銀メッキやクロムメッキ等の金属メッキを施し、或いは金属箔を接着してミラー面を形成したものが挙げられる。また、金属、シリコンウエハ等の、それ自身が鏡面加工可能な物質で構造体1を構成し、窪みを設ける加工の際に、そのまま底面がミラーを形成するもの、窪みを設けた後、窪みの底面をミラー加工するもの等を挙げることができる。ここで、少なくとも底面3がミラーであればよく、構造体の表面全体がミラーであっても良い。

【0021】

シリコンウエハで図1（A）の構造体1を構成する場合は、シリコンウエハを例えば、機械研磨、化学エッチング等の常法により加工して、細胞を収納する窪みを形成することにより作製することができる。例えば、図1（A）の場合は、3のミラーは、シリコンウエハの底面が鏡面状態を呈することにより形成されている。なお、前述した窪みの形成工程によっては底面が十分な鏡面状態を呈し

得ない場合には、必要に応じて、更に、窪みの底面を鏡面仕上げとする加工を施しても良い。

【0 0 2 2】

大きさは、通常の顕微鏡で利用できるサイズであれば足りる。収納部の深さは、例えば、細胞の顆粒構造を詳細に観察するためには、細胞がほぼ一層に並ぶ深さであることが望ましい。例えば、収納部は深さが $1 \sim 100 \mu\text{m}$ 、円形の場合は径 $1 \sim 5 \text{ mm}$ あれば充分であるが、これに限られることなく、必要に応じて適宜のサイズを選ぶことができる。

【0 0 2 3】

なお、構造体 1 の材質としては、それ自体が鏡面（反射面）加工が可能なもの、めっき等により反射面を形成可能なものであればよい。例えば、ガラス、石英等の無機化合物；ポリスチレン、メタクリル樹脂、ポリプロピレン、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンスルフィド等のプラスチック；ステンレススチール、アルミニウム、青銅等の金属や合金；セラミックス等の非金属無機材料を用いることができる。

【0 0 2 4】

図 1 (B) に示す観察器具は、例えばガラス、プラスチック等で構造体 1 を構成し、収納部 2 を設ける。さらに、収納部 2 の底面 4 に、表面が平滑で、かつ高反射率の材料の反射層を形成する。例えば、シリコンウエハの箔乃至膜を接着したり、銀メッキ等を施す。

【0 0 2 5】

図 1 (C) に示す観察器具は、対物レンズに対向することになる面の反対面 4 1 に反射面を設けたことを特徴とする。構造体 1 は、観察する波長域の光を透過する材質で構成される。例えば、ガラス、石英等の無機化合物、ポリスチレン、メタクリル樹脂、ポリプロピレン、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンスルフィド等のプラスチック等で構成される。この観察器具によれば、収納部を洗浄する場合等においても反射面を傷つけることがなく、反射面の維持が容易である

4 1 の反射面は、構造体 1 の材質に合わせて、めっき加工することにより形成

できる。めっきは、表面が平滑となり、かつ反射率の高い材料、例えば銀等の金属のめっきが挙げられる。

【0026】

図2 (A) に示す観察器具は、光を透過する構造体1と、構造体40のとの間に反射面が設けてある。この観察器具は、構造体1の収納部2の反対面に、反射面が形成された構造体40をはり合わせて作成できる。この観察器具は、構造体1と構造体40との加工を別に行い、最後に結合させて作成されるで作成が容易である。構造体1と構造体40は、例えば、バルサム、光硬化型合成樹脂接着剤等の光学接着剤等で接着してもよい。また、接着剤等を使用しないで、観察時に構造体1と構造体40を重ねて合わせて用いるようにしてもよい。重ね合わせて用いる場合は、クリップ等の固定器具で、構造体1と構造体40を重ねて挟持し固定して用いることができる。

【0027】

図2 (B) に示す観察器具は、図2 (A) に示す観察器具に類似するが、光を透過する構造体40の対物レンズに対向することになる面と反対の面43に反射面を設けている点が異なる。構造体1は、光を透過する材質で構成される。この観察器具によれば、構造体40の厚さを調節することで、容易に、観察対象物の位置と反射面との距離を調節することができる。

【0028】

本実施形態の観察器具を、細胞の観察に使用するには、収納部に細胞を培養液と共に入れ、図3 (A1) に示すようにカバーガラス(図3の5)で覆い、対物レンズに可視光を導入する照明装置を用い、通常の顕微鏡で観察乃至検出するか、又は対物レンズに結合させたCCDカメラを用いてモニターする。可視光を導入する照明装置としては、例えばユニバーサル照明装置として市販されている日本光学製「ニコンEPI-U」などを使用することができる。

【0029】

なお、図3 (A1) ではカバーガラス5が構造体1の上部に設置された場合を示しているが、図3 (A2) に示すように、全体を上下逆向きにして、下方から観察するという使用の仕方もできる。

【0030】

また、図3 (B) (C) のような観察器具であってもよい。図3 (B) の観察器具は、観察対象物を収納部2の窪みに入れた後、対物レンズに対向する面44に反射面を有する構造体40で収納部2をカバーできるように構成されている。

【0031】

また、図3 (C) の細胞観察器具は、光を透過する構造体40の対物レンズに対向する面の反対面45にミラー面が設けられている。この観察器具によれば、構造体40の厚さを調節することで、観察対象物の位置と反射面との距離を容易に変化させることができる。

【0032】

また、本実施形態の観察器具は、図4 (A) に示すように、観察対象物を注入する注入口6を設け、カバーガラス5の上に構造体1を載せて使用することができる。この場合、観察は下方向から行う。例えば、細胞を培養液とともに、注入口6から注入することができて、観察操作が簡便となる。

【0033】

また、本実施形態の観察器具を用いて観察する場合、観察対象物、例えば、細胞はガラス面に接着している必要はなく、浮遊状態、例えば液体中を流れている状態の細胞を観察することもできる。即ち、図4 (B) (C) に示すように、構造体1に液体が通過できるように、穴7、8を設け、一方の穴から細胞を含む液体を流し、流れの中における細胞の状態を観察することもできる。この目的のためには、図6に示すように、細胞収納部9を有する透明なチューブ12の内壁11に反射面を形成させたものであっても良い。

【0034】

上記説明した観察器具は、必要に応じて、収納部に、図5に示すように、目盛りを刻んで、細胞等の算定ができるようにすることもできる。この場合でも、本実施形態の観察器具によれば、微小透明物体をコントラストよく観察できるので、算定が容易となる。

【0035】

本実施形態の細胞観察器具を用いると、通常の光学顕微鏡を用いて肉眼により

観察する場合、又は通常のレンズとCCDカメラを用いたモニターにより観察する場合において、細胞、例えば好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、リンパ球等の血液細胞やその他の動物細胞、或いは植物のプロトプラスト等を、顆粒成分まで含めて鮮明な映像として細胞を観察することができ、従来のように、位相差顕微鏡の如き特殊な装置を使用する必要がない。

【0036】

次に、本発明を適用した第2実施形態として、上記で説明した細胞観察器具を用いた観察方法について、さらに詳しく説明する。

【0037】

本発明の観察方法は、細胞等の微小透明物体をコントラスト良く観察できることを特徴とする。ここで、本発明にかかる観察方法について説明する前に、本発明の観察方法によって微小透明物体をコントラスト良く観察できることに関する原理について簡単に説明する。

【0038】

従来の透過観察顕微鏡において、観察対象物の像のコントラストのつきかたは、図17に示すようになる。すなわち、媒質101中にある観察対象物102を照明光の入射波面103が透過すると、媒質101と物体102の屈折率が異なることにより、観察対象物102を射出した射出波面104は変形を受ける。射出波面の微小要素105は、それぞれの波面に垂直な方向に進行する。従って、変形を受けた射出波面の微小要素105は、入射波面104の進行方向とは異なる方向に進行する。対物レンズ106は、開口数で示されるある一定の角度範囲の波面で物体像を形成する。観察対象物102の周辺部分などによって強く変形を受けた射出波面の微小要素105の一部が、対物レンズ106の開口数で示される角度範囲から外れて進行すると、像の一部に影が発生し、観察対象物102がコントラストを伴って結像することになる。但し、例えば培養液中の細胞など、物体102と媒質101の屈折率に差があまりない場合は、変形を受けた射出波面の微小要素105も対物レンズ106の開口数で示される角度範囲内で進行するため、物体像に明暗のコントラストがほとんどつかない。従って、通常の透過観察顕微鏡では、培養液中の細胞の像は観察しづらかった。

【0039】

これに対し、本発明の観察方法において、観察対象物の像のコントラストのつき方は、図10に示すようになる。すなわち、反射面207に近接した物体202を落射照明で観察することにより、入射波面203は観察対象物202を一度透過した後反射面207により反射され、更にもう一度観察対象物202を透過する。入射波面203が観察対象物202を二度透過することにより形成された射出波面204は、従来の透過観察顕微鏡における場合の2倍の変形を受けることになる。従来の透過観察顕微鏡においては、射出波面の微小要素205の一部は対物レンズ206の開口数で示される角度範囲内で進行していたが、本発明の観察方法によれば、その範囲から外れて進行するようになり、観察対象物の像上に影を形成する。したがって、従来の透過観察顕微鏡よりも像に明暗のコントラストがつきやすくなる。そして、通常の透過観察顕微鏡では観察しづらかった培養液中の細胞でも、コントラスト良くはっきりと観察することが可能となる。

【0040】

以下に、本発明の第2の実施形態について、図面を参照して説明する。

【0041】

図7は、本発明の一実施形態が適用された観察装置の概略図である。図示するように、本実施形態の観察装置は、落射観察顕微鏡311と、底面にミラーコーティング307の施された培養皿312とを有する。

【0042】

落射観察顕微鏡311は、鏡筒315と、ステージ317と、光源部313と、落射投光管314と対物レンズ306と、これらを一体に支持する鏡基316とから構成される。ステージ317は、その上面に培養皿312を設置できるようになっている。ステージ317は、合焦ノブ318を回動することにより、上下方向に変移可能に鏡基316と連結されている。

【0043】

図8に、落射観察顕微鏡311の光学系の構成を示す。図8に示すように、光学系は、照明光を発生するための光源813と、光源813から発した照明光の進行方向をそろえるためのコリメートレンズ841と、進行方向がそろった照明

光の進行方向を鉛直方向に偏向するための半透鏡 842 と、照明光を観察する物体を含む標本 808 上に集光するとともに標本 808 を拡大投影する為の対物レンズ 806 と、標本 808 の像を像面 845 に結像する為の結像レンズ 846 と、標本 808 を一度透過した照明光を反射して戻す為の反射面 807 をもつミラー 849 とから構成される。

【0044】

結像レンズ 846 は鏡筒 315 に格納されている。光源 813 は光源部 313 に、コリメートレンズ 841 及び半透鏡 842 は落射投光管 314 に格納されている。

【0045】

以上のように構成される観察装置を用いて、観察対象物を観察する場合、以下のようにする。

【0046】

図 9 に示すように、観察器具の収容部に、培養液 301 とともに観察対象物（例えば細胞 302）を入れる。培養皿 312 をステージ 317 の上面に設置する。光源 313 からの照明光の明るさを、適宜調節する。合焦ノブ 318 を回動させることによりステージ 317 を上下方向に変移させて、焦点をあわせて観察する。

【0047】

本実施形態の観察方法においては、観察対象物と前記反射面との距離 d が下記式 (1) を満たすのが好ましい。

【0048】

$$d \leq W / (2 NA^2) \quad \dots (1)$$

(式中、 d は観察対象物と反射面との距離を表し、 W は観察に用いる光の波長を表し、 NA は光学系の開口数を表す。)

観察対象物と反射面との距離 d は、媒質の密度を調節することで調整できる。例えば、観察対象物が媒質よりも密度が高ければ、重力作用により自動的に観察対象物は培養皿 312 の底部に沈殿し、そこにある反射面と近接することとなる。

【0049】

なお、上記式を満たすことで、コントラスト良く観察できることに関する原理については、以下のように説明することができる。上記式を満たす場合、観察対象物は、観察する光学系の焦点深度の約半分以内の距離で、反射面に近接して設置されることになる。そして、一度観察対象物を透過した入射波面が、ほぼ形を崩さずに再び観察対象物を通過することになる。これにより、特に観察対象物の端において射出波面がはっきりと折れ曲がるようになる。したがって、観察対象物の像をコントラスト良く観察できる。以下に、より詳しく、シミュレーションを用いて説明する。

【0050】

図11は、細胞302を、直径4 μm 、高さ2 μm の回転楕円体であるとして、細胞302の屈折率を1.4とし、培養液301の屈折率を1.33とした計算モデルを用いた場合の、結像シミュレーションを行った結果を示す。なお、図11は結像のスケッチ図である。ここで、521は中心線、522は中心線上の強度分布、523は細胞302の結像である。観察に用いる光の波長は、550 nmとした。本シミュレーションにおいては、落射照明光が往復2回細胞302を透過することにより、図11(b)に示したとおり、細胞302の輪郭を明暗のはっきりとしたコントラストで観察することができる。一方、同じ条件の細胞302を、従来の透過観察方法により観察した場合の結像シミュレーションを行った結果は、図11(c)に示したとおり、細胞302の輪郭がはっきりとしない。

【0051】

但し、細胞302とミラーコーティング307の距離が離れると、細胞像のコントラストが低下する。本実施例における、観察光学系の焦点深度 Δ は、以下の式で求まる。

【0052】

$$\Delta = W / NA^2 = 0.55 \mu\text{m} / 0.452 = 2.7 \mu\text{m}$$

(式中、Wは使用する光の波長を表し、NAは落射観察顕微鏡311に装着されている対物レンズ306の開口数を表す。)

すなわち、焦点深度 Δ の半分は約 $1.4\ \mu\text{m}$ である。図12 (b) ~ (f) に、図12 (a) に示すように、細胞302とミラーコーティング307の間の距離 d を変えた計算モデルを用いた結像シミュレーションの結果を示す。距離 d は、(b) $1\ \mu\text{m}$ 、(c) $1.2\ \mu\text{m}$ 、(d) $1.4\ \mu\text{m}$ 、(e) $1.6\ \mu\text{m}$ 、(f) $1.8\ \mu\text{m}$ である。図に示すように、距離 d が $1\ \mu\text{m}$ から離れるに従って、細胞302の輪郭のコントラストが低下し、距離 d が $1.4\ \mu\text{m}$ を越えるとほとんど見えなくなること示している。

【0053】

以上より、細胞302とミラーコーティング307の間隔は、焦点深度 Δ の約半分以下であることが好ましいことが分かる。

【0054】

また、本実施形態の一例においては、観察対象物と反射面との距離 d が、以下の式(2)を満たすのが好ましい。

【0055】

$$d > F / (4 \tan(\sin^{-1} NA)) \quad \dots (2)$$

(式中、 d は観察対象物と反射面との距離を表し、 F は観察対象物を観察する光学系の視野径を表し、 NA は観察対象物を観察する光学系の開口数を表す。)

図3 (A2) のように観察器具を用いる場合は、観察対象物は、重力によってカバーガラス5上に位置することになるので、収納部2の窪みの深さ a を加工により調節することで、観察対象物と反射面との距離 d を調節できる。

【0056】

また、図1 (C) の観察器具等の場合は、収納部の窪みの深さを加工により調節し、窪みの底面と反射面との距離を調節することにより、観察対象物と反射面との距離を調節できる。図2 (B) の観察器具等の場合は、構造体40の厚さを調節することで、観察対象物と反射面との距離を調節できる。

【0057】

また、観察対象物と反射面との距離 d は、媒質の密度を調節することで調整できる。例えば、観察対象物が媒質よりも密度が小さければ、自動的に観察対象物は培養皿312の底部から離れ、そこにある反射面と一定の距離をとることとな

る。

【0058】

なお、上記数式2を満たすことで、コントラスト良く観察できる原理については、以下のように説明することができる。上記数式2を満たすと、反射面が、観察対象物よりある程度遠ざかることになる。実質的に照明光の開口数が低下することになる。したがって、物体をコントラスト良く観察できる。

【0059】

より具体的には、図13に示すように、対物レンズ1006の焦点位置にある物体1002を、物体1002から距離d離れた位置に反射面1007を持つミラー1049を配置して、落射照明で観察する場合を考える。対物レンズ1006より直接物体1002近傍を照明する照野1009は、対物レンズ1006またはそれを含む観察光学系の仕様により、直径Fに制限されている。対物レンズ1006から射出し、物体1002近傍を一度透過して、反射面1007で反射し、再び物体1002を照明する照明光は、反射面1007の鏡像作用により、あたかも照野1009の鏡像1009'が光源面となって物体1002を照明しているように見える。この場合、物体1002から見た照明光の最大の角度 θ_{i_max} は、次の式で与えられる。

【0060】

$$\tan \theta_{i_max} = F / (4d) \quad \dots (3)$$

したがって、物体1002に対する実質的な照明光の開口数 $\sin \theta_{i_max}$ は、

$$\sin \theta_{i_max} = \sin (\tan^{-1} F / (4d)) \quad \dots (4)$$

の式で与えられる。これが、対物レンズ1006の開口数NAよりも小さい条件 $NA > \sin \theta_{i_max}$ …数式5

つまり、

$$d > F / (4 \tan (\sin^{-1} NA)) \quad \dots (2)$$

ならば、実質的な照明光の開口数は、対物レンズの開口数NAよりも小さいことになり、物体1002の観察像のコントラストが向上することとなる。

【0061】

照明光の開口数が、対物レンズの開口数よりも小さい場合に、物体の観察像のコントラストが向上する様子を計算したシミュレーション例を、図14を用いて説明する。図14(a)は、直径 $5\mu\text{m}$ 、厚さ $2\mu\text{m}$ の回転楕円体の形状をした細胞1102が、培養液1101の中にある計算モデルを示す。細胞の屈折率を1.4、培養液の屈折率を1.33とした。照明光の波長は 550nm とした。対物レンズの開口数は0.45であるとした。図14(b)～(f)は、照明光の開口数が対物レンズの開口数の、(b)100%、(c)80%、(d)60%、(e)40%、(f)20%であるときの、計算例を示す。照明光の開口数が、対物レンズの開口数よりも小さくなるにつれ、物体像のコントラストが向上していることが分かる。

【0062】

次に本発明を適用した第3の実施形態である微小流路観察装置について説明する。第3実施形態にかかる微小流路観察装置は、観察対象物収容部に特徴があり、細胞の移動の観察に適している。

【0063】

観察対象物収容部は、図15に示すように、微小流路612を有する。微小流路612は、シリコン基板631に構築されている。本実施形態では、観察対象物を不図示の倒立型落射照明顕微鏡により下方から観察する。図15中、606は、対物レンズを示す。

【0064】

微小流路612には、入口632が1つと、出口633が3つ設けられている。入口632と出口633は、微小流路612内部でつながっている。微小流路612は、半導体製造技術を用いて、シリコン基板上に酸化シリコン634によるパターン形成を行い、そのパターンを覆うようにガラス板635で蓋をすることにより製造される。

【0065】

なお、酸化シリコン634の膜厚は、細胞602の厚さとほぼ同じに形成されている。したがって、細胞602が微小流路612を通過する際は、細胞602はシリコン基盤の表面607にほぼ接した状態となり、細胞602の輪郭が常に

コントラスト良く観察されるようになっている。

【 0 0 6 6 】

なお、この微小流路 6 1 2 の入口 6 3 2 に接して、細胞溜めの部分を形成し、微小流路 6 1 2 に流す細胞 6 0 2 を一時的に溜めておくようにしてもよい。その場合、細胞溜め部分のシリコン基盤に深く穴をあけることにより、その部分で反射面として作用するシリコン基盤の表面が、ガラス板 6 3 5 から遠く離れるようにしておく。このようにすると、この細胞溜めの部分においては、実質的な照明光の開口数が低くなるので、細胞溜めの中にある細胞 6 0 2 をコントラスト良く観察することができる。

【 0 0 6 7 】

また、微小流路 6 1 2 には、図に示すように、電圧制御装置 6 5 0、可変電圧発生装置 6 6 0 および二つの電極 6 6 5 からなる電界発生装置が取り付けられている。二つの電極 6 6 5 は、微小流路 6 1 2 の側面に取り付けられており、電氣的に接続された可変電圧装置 6 6 0 で発生した電圧を微小流路 6 1 2 側面に印加することにより、微小流路内部に電界を発生させる。可変電圧発生装置 6 6 0 は、電氣的に電圧制御装置を接続しており、図示されてない倒立型落射顕微鏡による細胞 6 0 2 の観察方法に基づいて、可変電圧発生装置 6 6 0 で発生させる電圧を制御し、細胞 6 0 2 の進行方向を三つある出口 6 3 3 のうちどれかに向かうように振り分ける。複数の細胞 6 0 2 が、入口 6 3 2 より順に微小流路 6 1 2 内に流入し、対物レンズ 6 0 6 を通して落射観察される。シリコン基盤の表面 6 0 7 が反射面として作用し、微小流路 6 1 2 内の細胞 6 0 2 は、コントラスト良く観察することができる。この観察された情報に基づいて、電界発生装置は微小流路 6 1 2 内の電界強度を切替える。微小流路 6 1 2 内の細胞 6 0 2 は、内部の電界強度によって進行方向を制御され、3つある出口 6 3 3 に仕分けして排出される。

【 0 0 6 8 】

このように、本実施例の微小流路観察装置を用いれば、細胞 6 0 2 の観察手段として落射照明顕微鏡を用いた為に、微小流路 6 1 2 をシリコン基板 6 3 1 上に構築することができる。シリコン基板 6 3 1 上の微小流路は、半導体製造技術を

用いることができるので、従来のガラス基板上に微小流路を構築する場合に比較して、安価で大量に生産することができる。更に、従来の特殊顕微鏡を用いた観察方法に比較して、透過照明装置が不要となり、微小流路 612 を保持するステージが簡略化されるなど、観察装置全体を小型化するとともに、安価で構築することが可能となる。

【0069】

なお、上記第3の実施形態においても、第2の実施形態で説明したように、観察対象物と反射面（鏡面）との距離が、式（1）及び式（2）を満たすようにするのが好ましい。

【0070】

以上、本発明の実施形態について説明した。

【0071】

上記実施形態においては、従来は非常に観察しづらい微小透明物体をコントラスト良く観察することができる。

【0072】

また、上記実施形態によれば、透過照明の為に光学系が必要ないため、観察装置全体の小型化が図れるという利点がある。また、物体の移動が困難な場合でも観察装置全体の移動により、容易に物体観察部位の調整ができるという利点がある。

【0073】

上記実施形態によれば、容器内に反射面を設けたことにより、物体が反射面に近接する状態を容易に実現できる。また、シャーレの底面に反射面を設けて、そのシャーレの中に観察する物体を含む媒質を注入した場合、物質が媒質よりも密度が高ければ、重力作用により自動的に物質はシャーレの底部に沈殿し、そこにある反射面と近接することとなる。

【0074】

なお、本発明は、上記の実施態様に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々の変形が可能である。

【0075】

【実施例】

図 1 8 に、図 3 (A 2) で示す観察器具を用いて、下方から細胞を観察し撮影した場合の写真を示す。構造体 1 は、シリコンウエハで構成されており、カバーガラス 5 と反射面との距離 a が、 $5\ \mu\text{m}$ である観察器具を使用した。また、撮影条件は以下の通りである。

【0 0 7 6】

撮影機器：CCD デジタルビデオカメラ CL-211 H (Watec America Co., Las Vegas, Nev)

照明装置：EPI-U (Nikon, Kawasaki, Japan)

対物レンズ： $\times 20$

培養液：RPMI 1640 緩衝液に 20mM HEPES 及び 0.1% ウシ血清アルブミンを加えたものを使用

細胞：好酸球

ヒト血液中の顆粒球分画に対して、抗 CD16 抗体が結合した磁気ビーズによるネガティブ・セレクションにより精製した好酸球を使用した。なお磁気ビーズには Dynal magnetic particle concentrator (Dynal A. S., Oslo, Norway) を用い、製品に付属の使用方法に従って操作した。

【0 0 7 7】

図 1 8 に示すように、微小な透明物体である好酸球細胞および細胞内顆粒が、コントラストよく観察できたことが分かる。

【0 0 7 8】**【発明の効果】**

本発明によれば、細胞等の透明な微小物体を、特殊な光学手段なしで、コントラスト良く観察することができる。

【0 0 7 9】

すなわち、本発明の細胞観察器具を用いると、通常の光学顕微鏡又は通常レンズと CCD カメラを用いたモニターにより、細胞、例えば好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、リンパ球等の血液細胞やその他の動物細胞、或いは植物のプロトプラスト等において、顆粒成分まで含めて鮮明な映像として細胞を

観察することができ、従来のように、位相差顕微鏡の如き特殊な装置を使用する必要がない。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 (A) ～ (C) は第 1 の実施形態にかかる観察器具の断面図である。

【図 2】図 2 (A) (B) はミラー面を有する構造体 4 0 を有する観察器具の断面図である。

【図 3】図 3 (A 1) ～ (C) は収納部を覆うカバーを有する観察器具の断面図である。

【図 4】図 4 は第 1 の実施形態にかかる観察器具の他の使用例であり、(A) はカバーガラス上に構造体 1 を載せた場合の断面図である。(B) は、液体が通過できる穴を設けた場合を示す概念図の断面図である。(C) は、(B) の観察器具の斜視図である。

【図 5】図 5 は収納部に目盛りを刻んだ観察器具の一例の上面図である。

【図 6】図 6 (A) は全体がチューブの形をした観察器具の断面図である。(B) は (A) の点線 A B 方向の断面図である。

【図 7】図 7 は第 2 実施形態の観察装置の構成を表す図である。

【図 8】図 8 本発明の観察法の光学系の構成を表す図である

【図 9】図 9 は培養皿と培養細胞を表す図である。

【図 1 0】図 1 0 は本発明による物体のコントラストのつき方を示した図である。

【図 1 1】図 1 1 (a) は、第 2 実施形態における結像シミュレーションの計算モデルを表す図である。図 1 1 (b) 及び (c) は、結像シミュレーションの計算結果を表す図である。

【図 1 2】図 1 2 (a) は第 2 実施形態における結像シミュレーションの計算モデルを表す図である。図 1 2 (b) ～ (f) は、細胞 3 0 2 とミラーコーティング 3 0 7 の距離が $1.0\ \mu\text{m}$ 、 $1.2\ \mu\text{m}$ 、 $1.4\ \mu\text{m}$ 、 $1.6\ \mu\text{m}$ 及び $1.8\ \mu\text{m}$ であるときの結像シミュレーションの計算結果を表す図である。

【図 1 3】図 1 3 は反射面による照明光の開口数の低下を表す図である。

【図14】図14(a)は照明光の開口数が対物レンズの開口数よりも小さい場合の物体像のシミュレーション例に用いた計算モデルを示す図である。図14(b)～(f)は、照明光の開口数が、対物レンズの開口数の100%、80%、60%、40%及び20%である場合の結像シミュレーションの計算結果を表す図である。

【図15】図15は第3実施形態の微小流路観察装置の構成を表す図である。

【図16】図16は従来の特殊観察法の光学系の構成を表す図である

【図17】図17は従来の透過観察顕微鏡における物体のコントラストのつきかたを表す図である。

【図18】図18は、図3(A2)に示す観察器具を用いて、好酸球細胞を観察したときに撮影した写真である。

【符号の説明】

1…ガラス等の構造体、プラスチック、金属、シリコンウエハ等で形成された構造体

2…細胞収納部、3…ミラーを形成する面、4…金属メッキ、金属やシリコンウエハの箔等のミラー、5…カバーガラス、6…細胞注入口、7, 8…液体が通過できる穴、9…チューブで構成される細胞収納部、10…透明な中部の内面、11…ミラーが形成されているチューブの内面、12…チューブ、15…目盛り、40…ガラス等の構造体、41～45…反射面が形成されている面

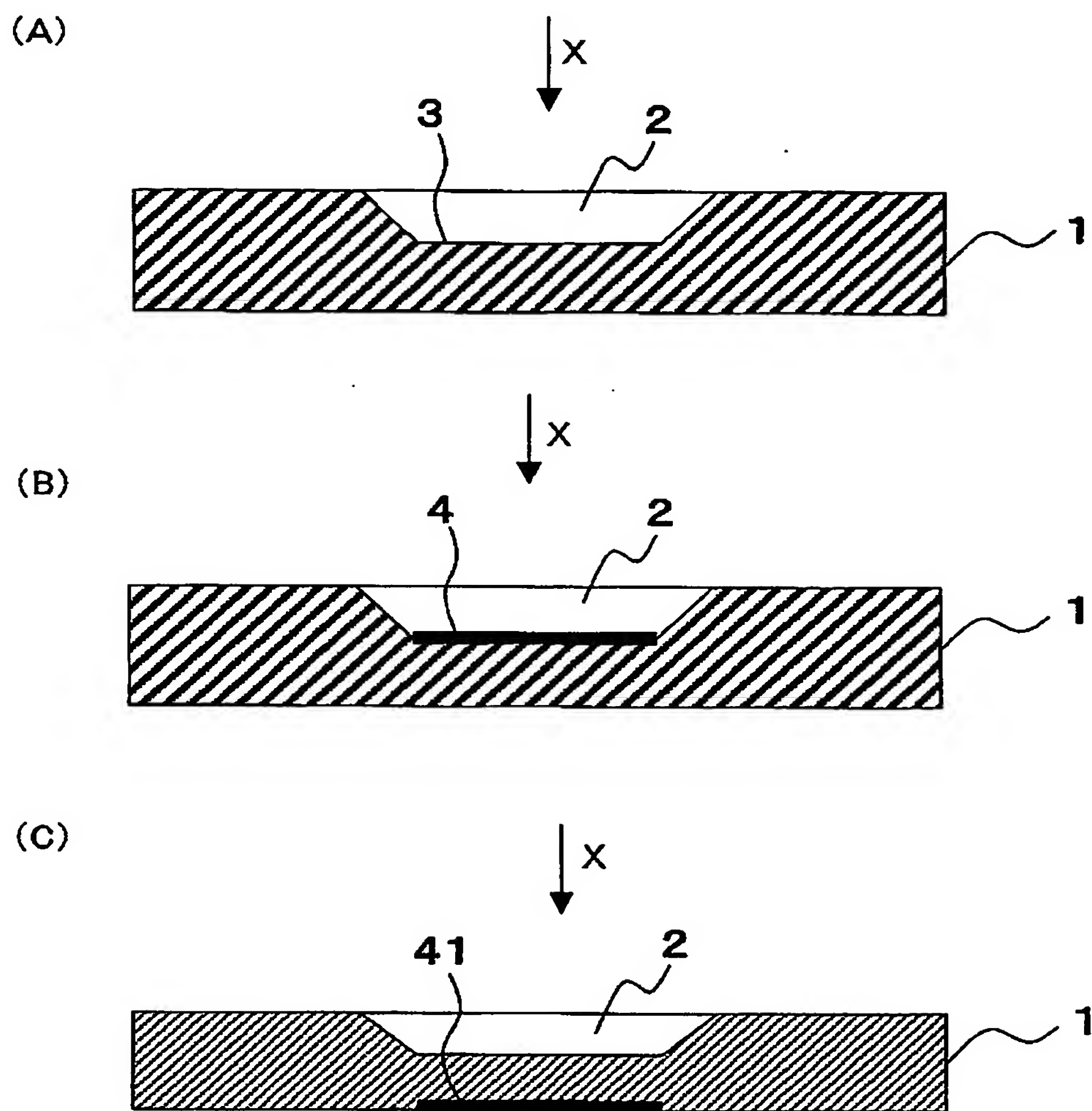
101, 201…媒質、102, 202, 1002…物体、103, 203…入射波面、104, 204…射出波面、105, 205…射出波面の微小要素、106, 206, 306, 606, 706, 806, 1006…対物レンズ、207, 807, 1007…反射面、301, 1101…培養液、302, 602, 1102…細胞、307…ミラーコーティング、311…落射観察顕微鏡、312…培養皿、313, 713, 813…光源、314…落射投光管、315…鏡筒、316…鏡基、317, 717…ステージ、318…合焦ノブ、521…中心線、522…中心線上の強度分布、523…細胞の結像、524…中心線、525…中心線上の強度分布、526…細胞の結像、607…シリコン基盤の表面、612…微小流路、631…シリコン基盤、632…入口、633…出口、634…酸化シリコ

ン、 6 3 5 … ガラス板、 7 0 8 , 8 0 8 … 標本

【書類名】 図面

【図 1】

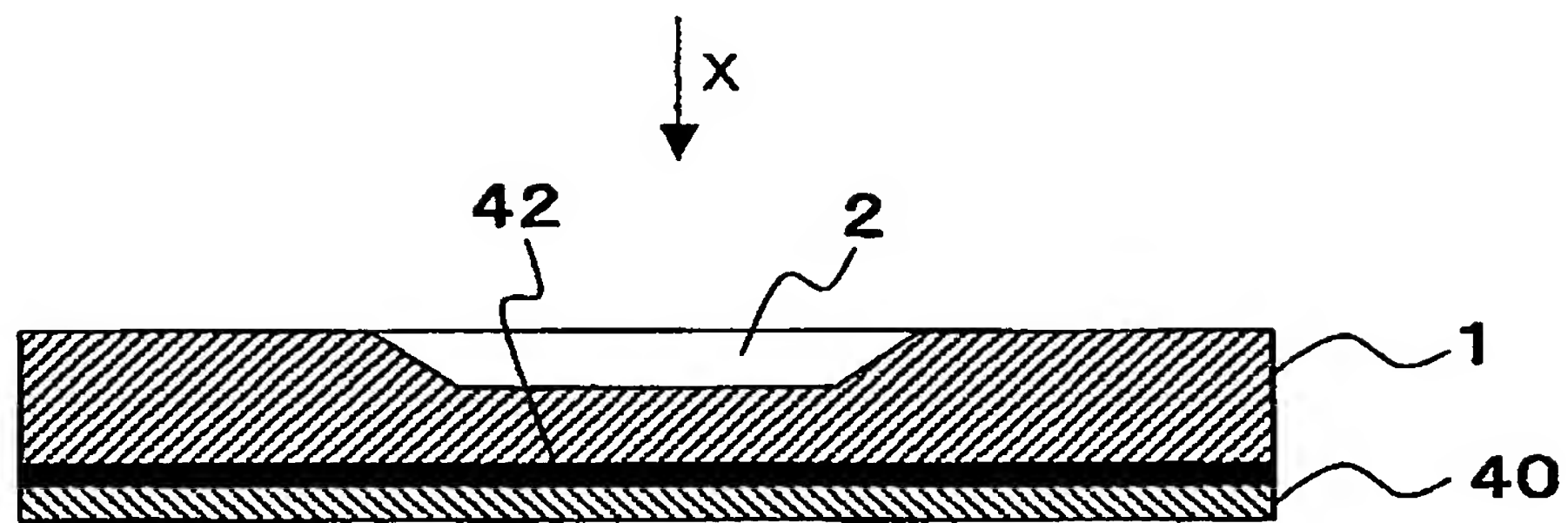
図 1



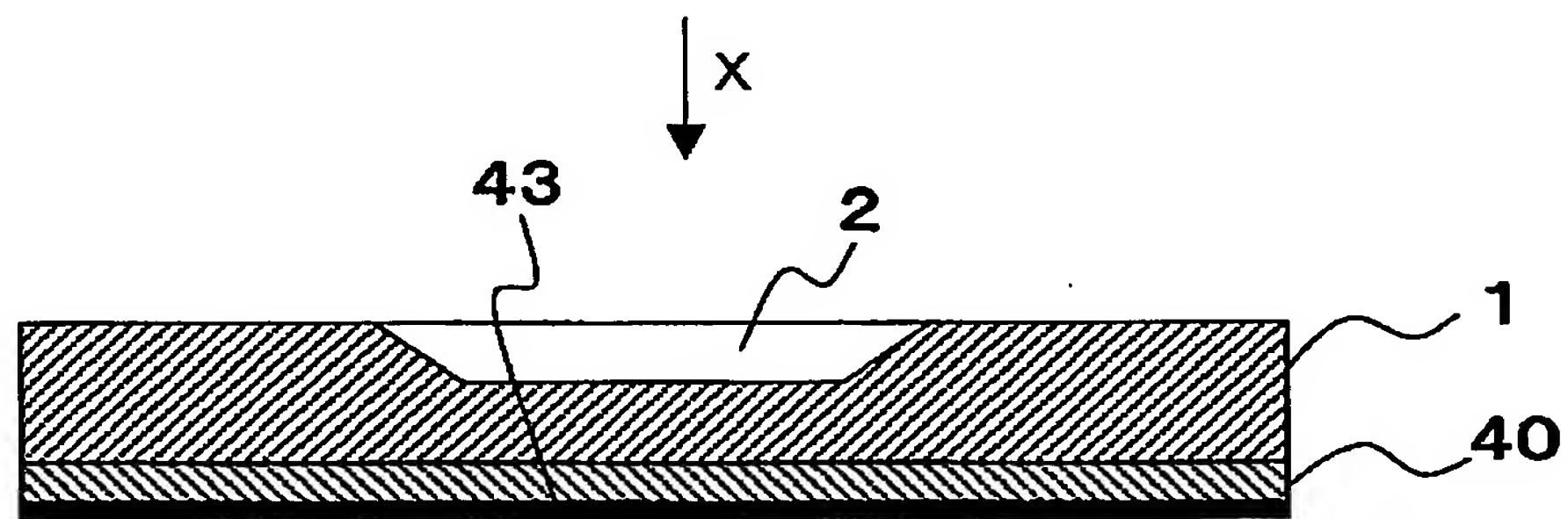
【図 2】

図2

(A)

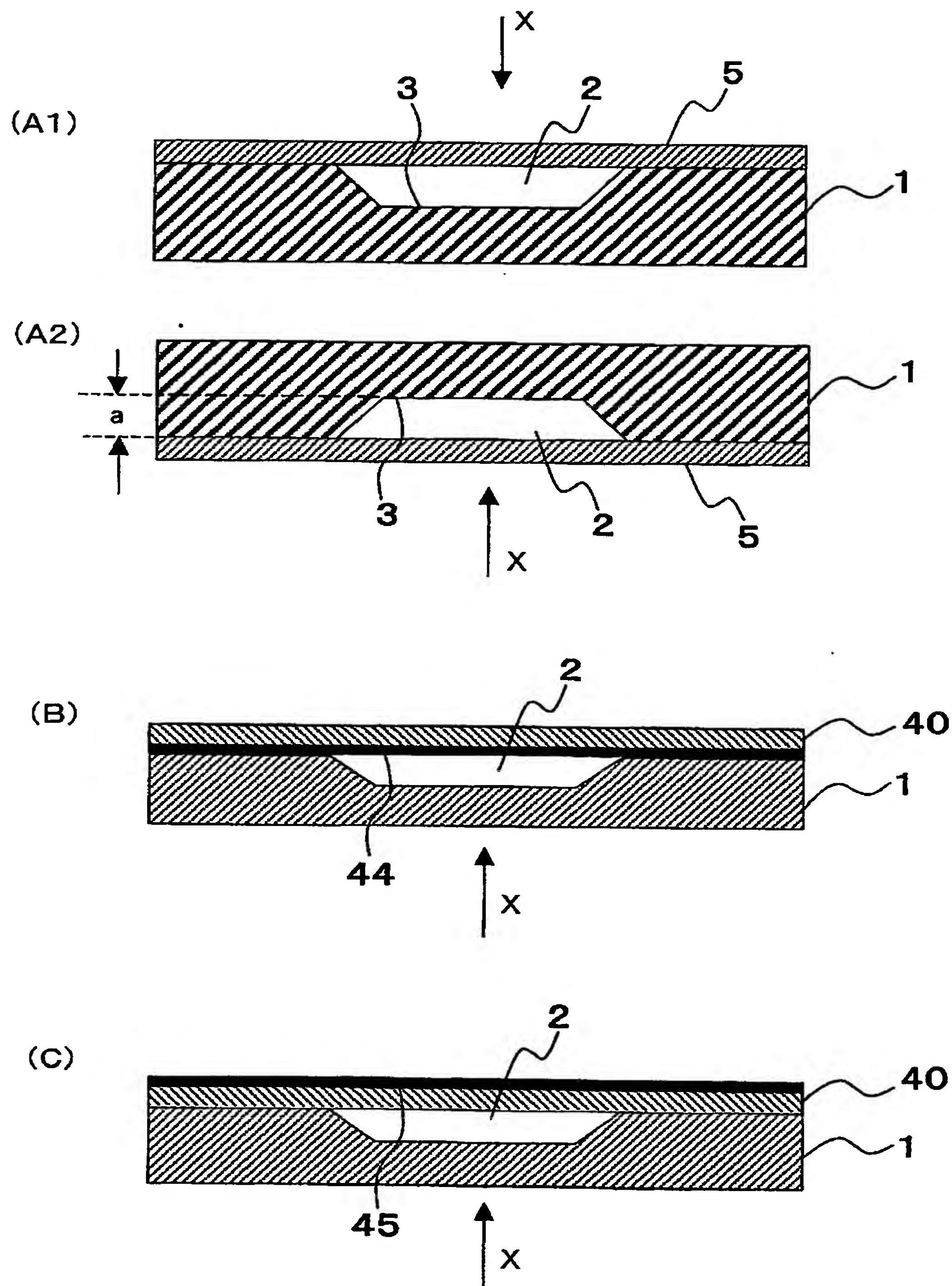


(B)



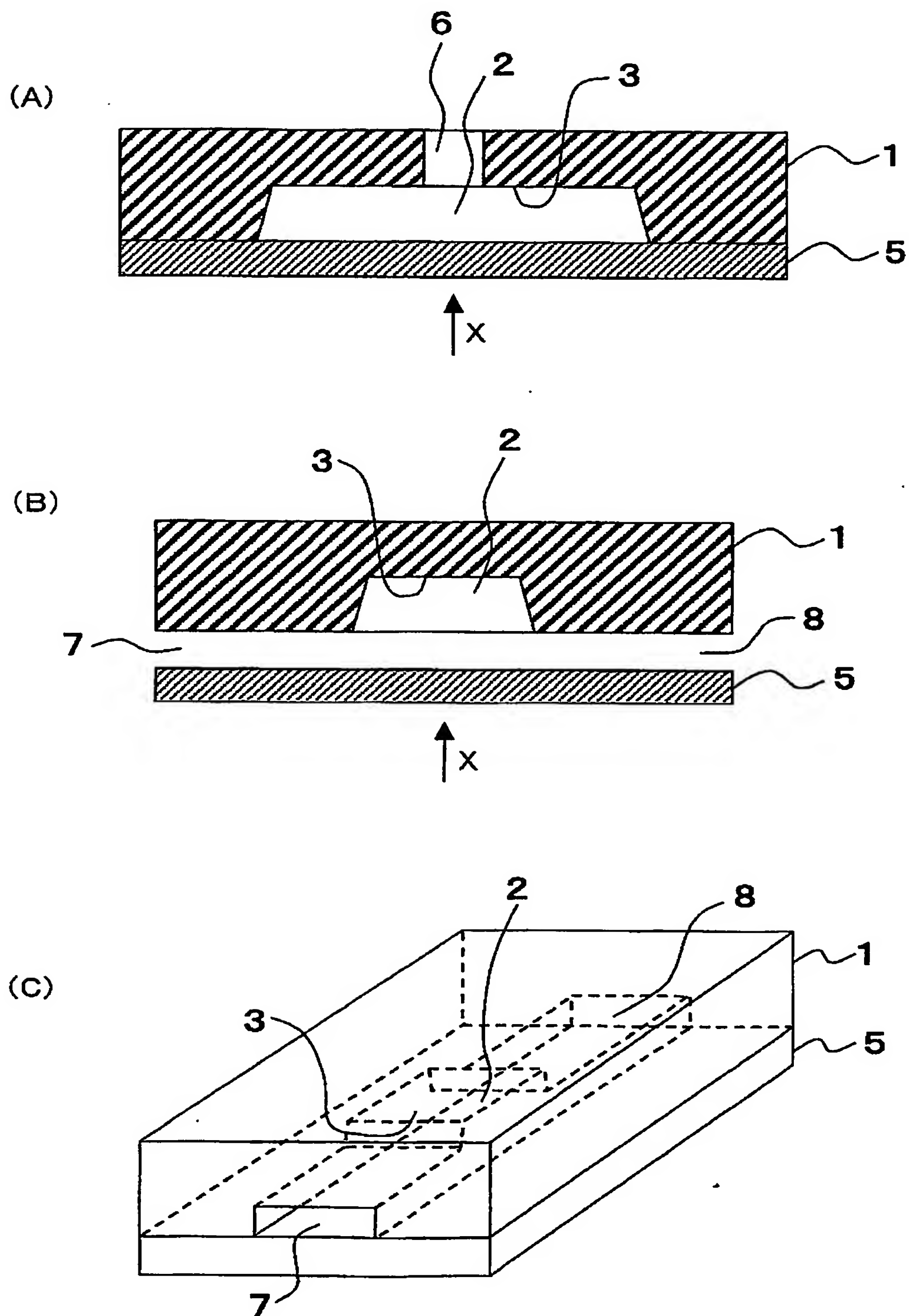
【図 3】

図3



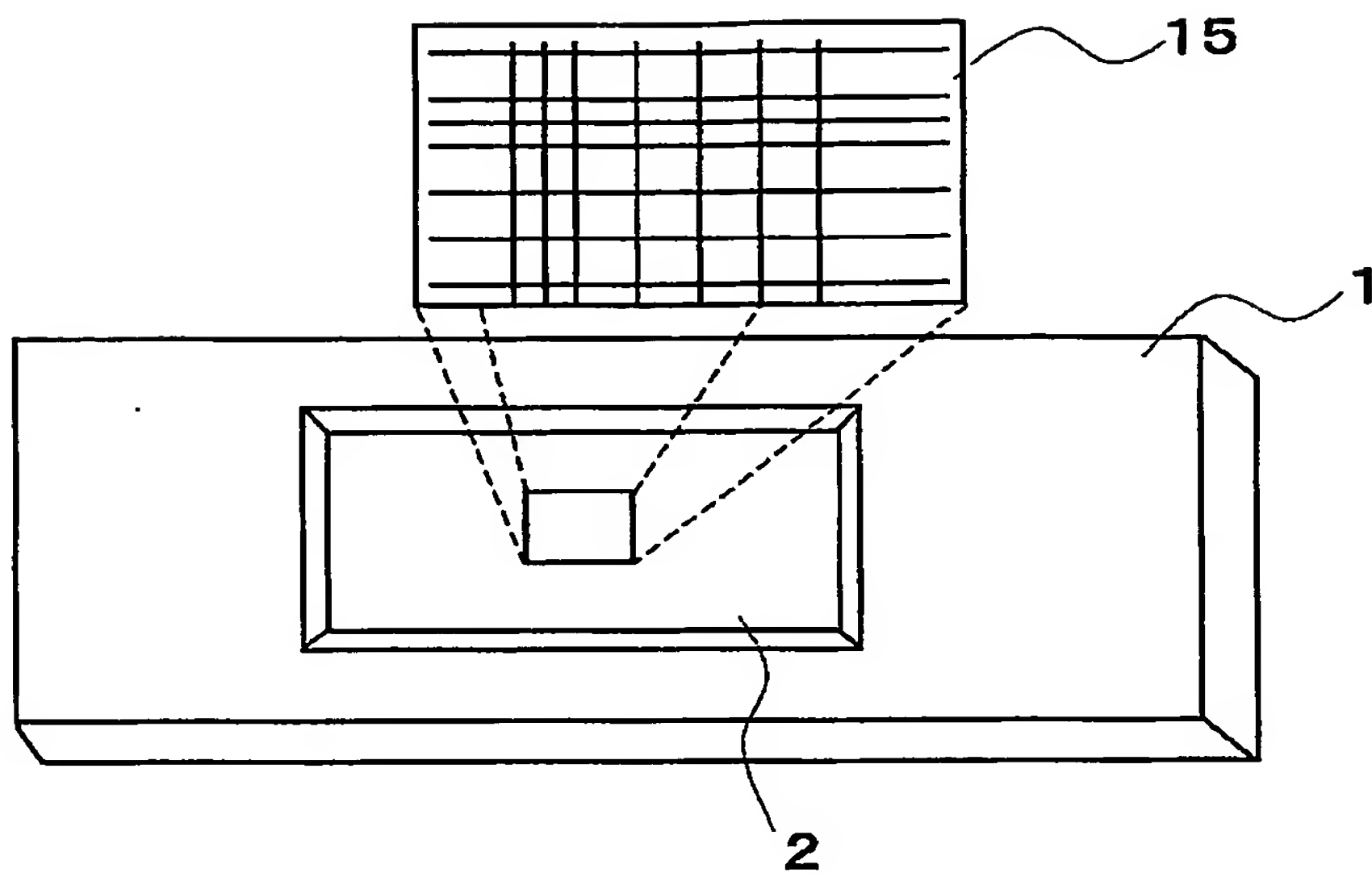
【図 4】

図 4



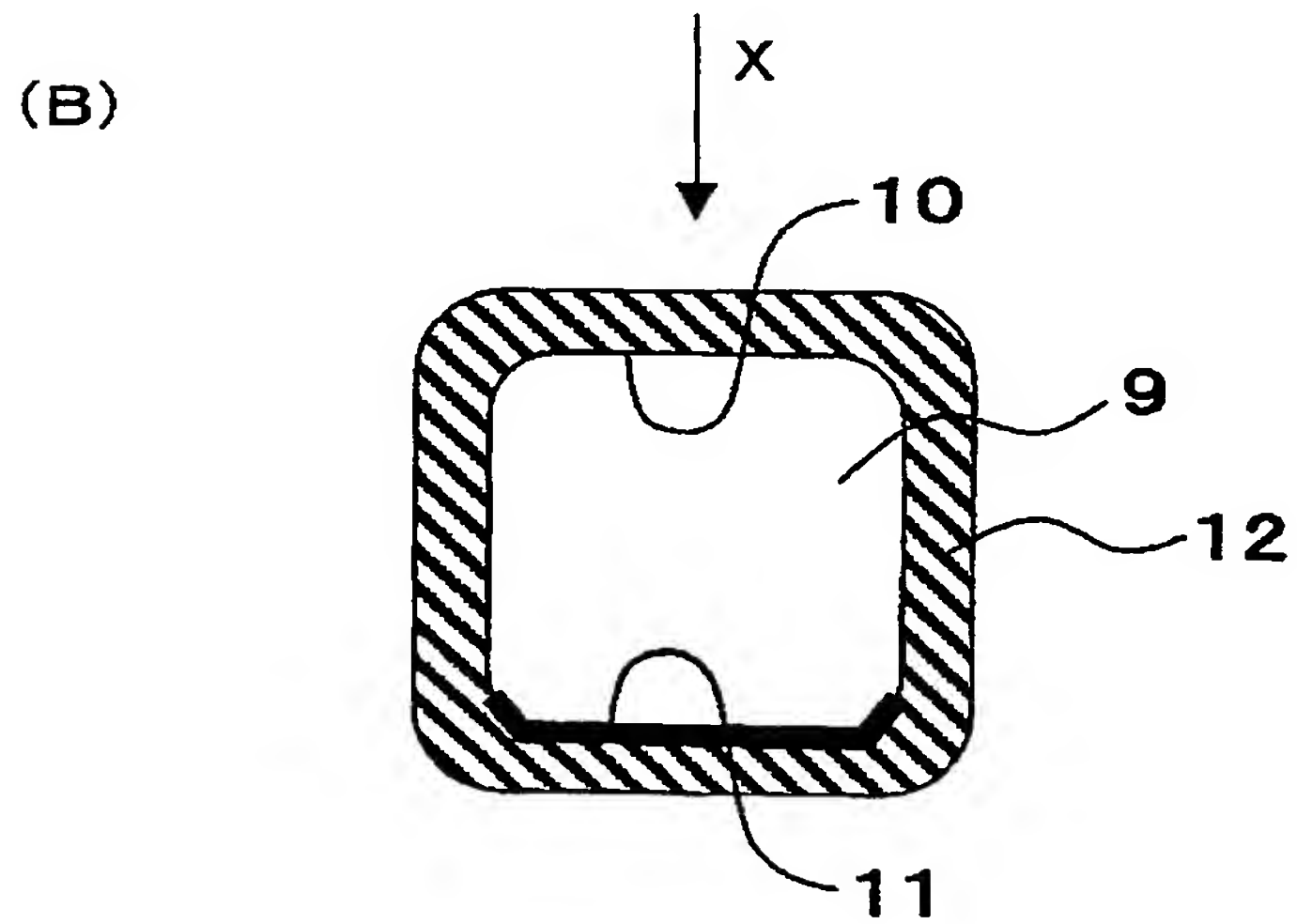
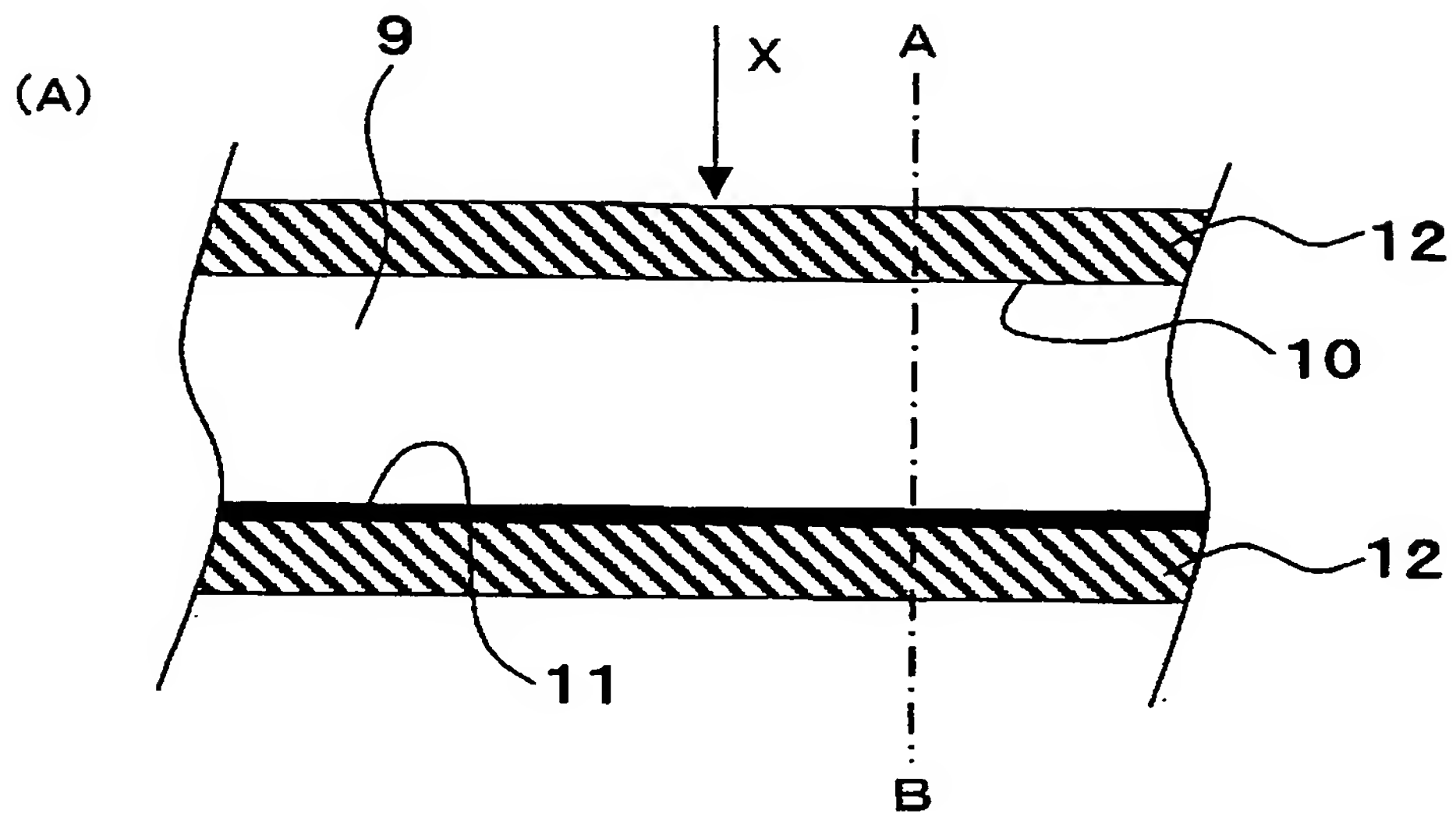
【図 5】

図5



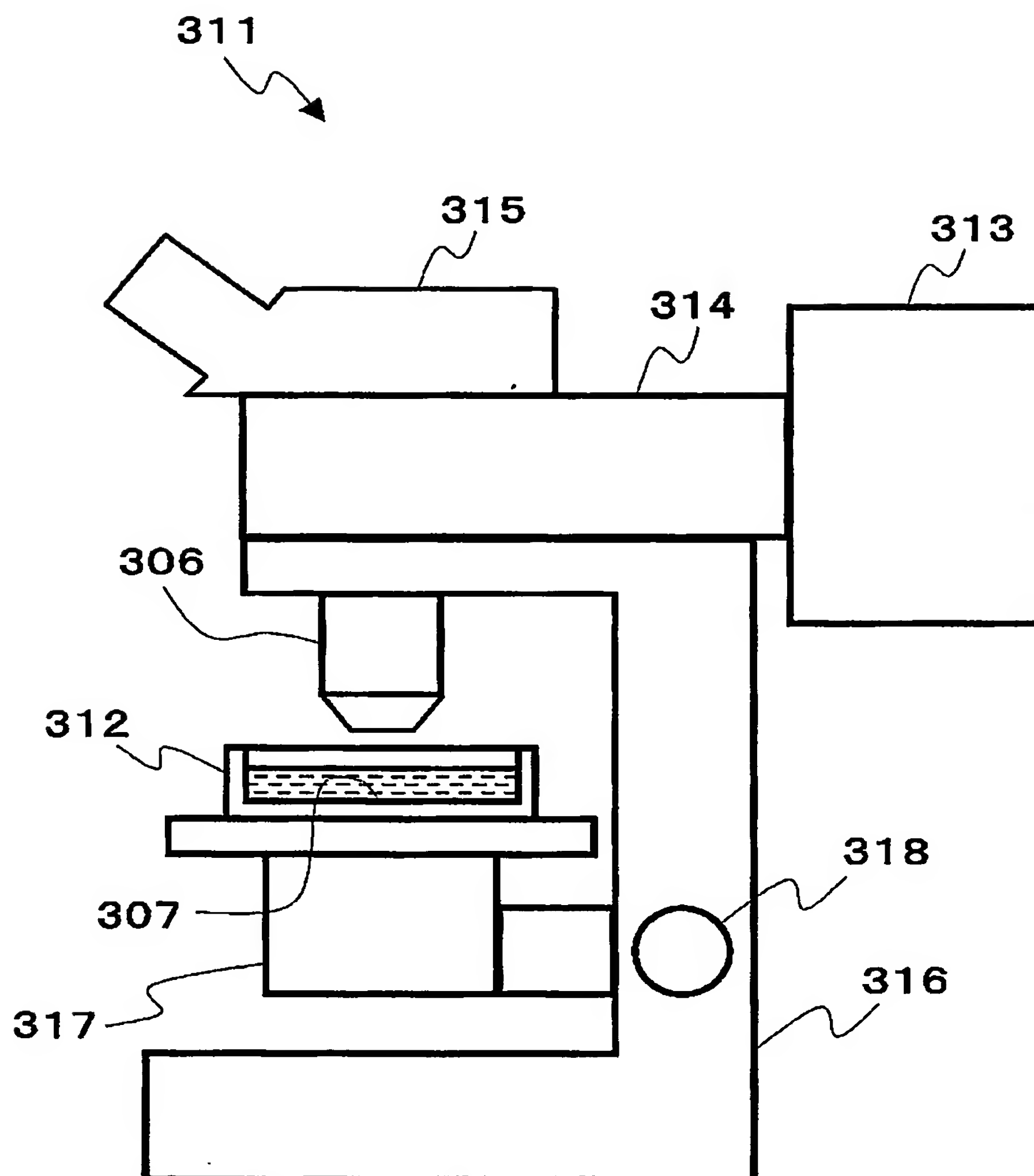
【図 6】

図 6



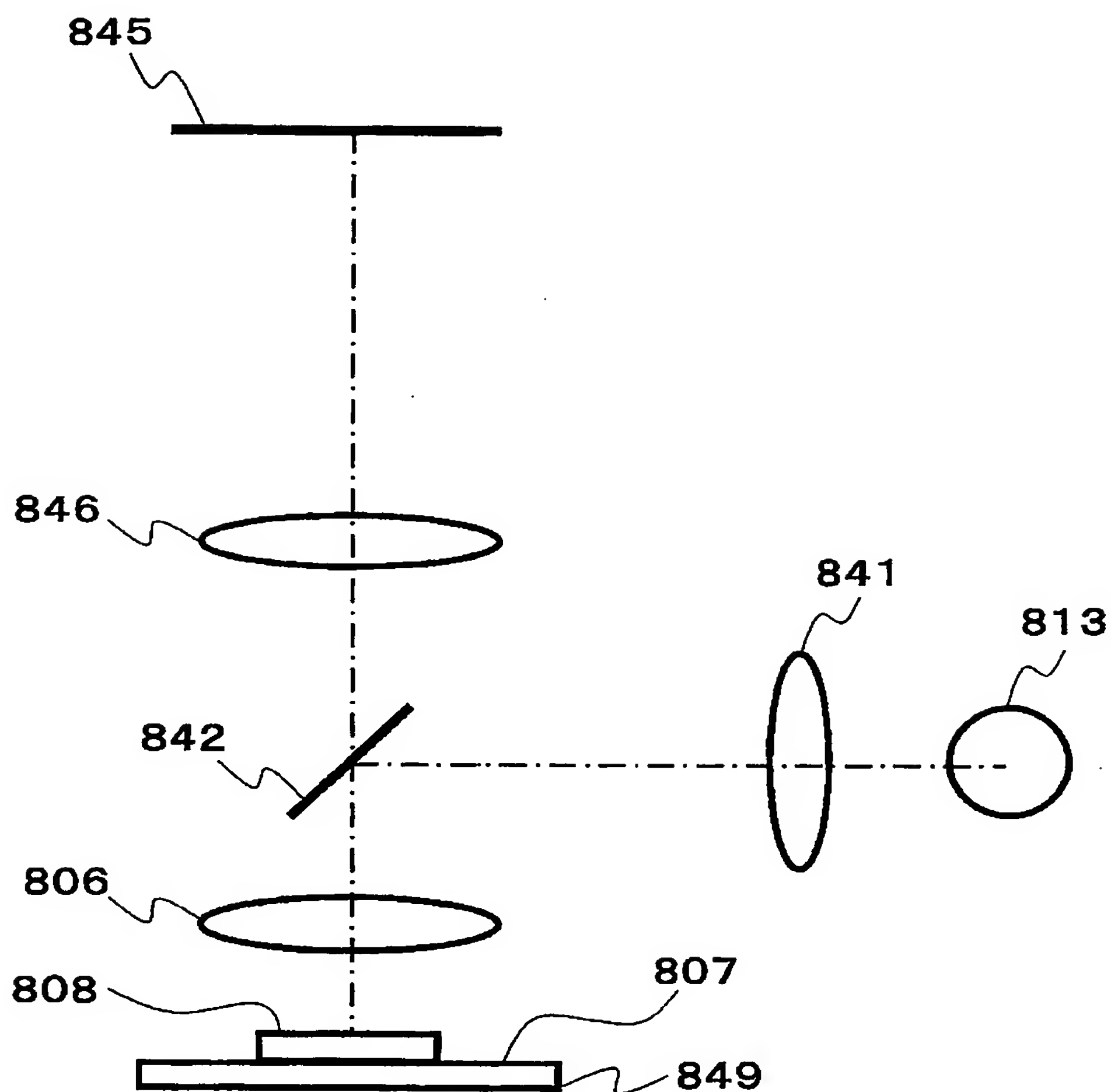
【図 7】

図7



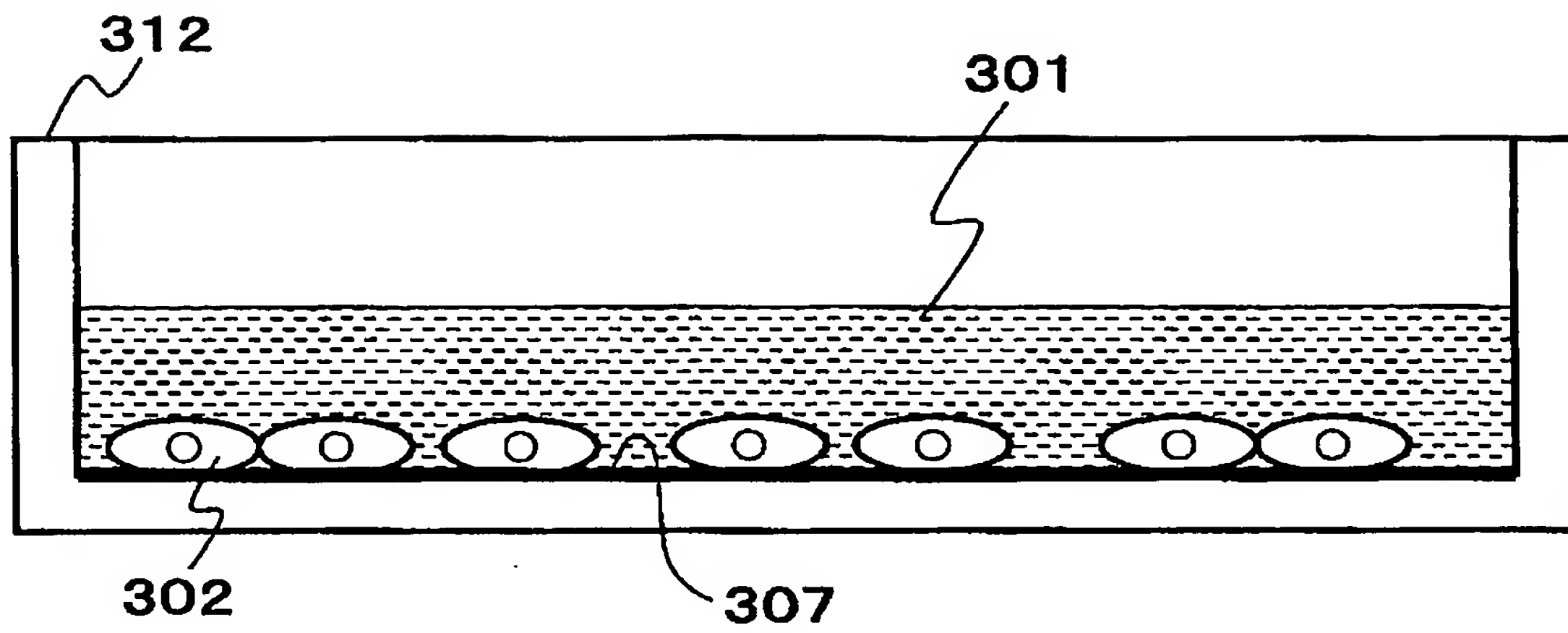
【図 8】

図 8



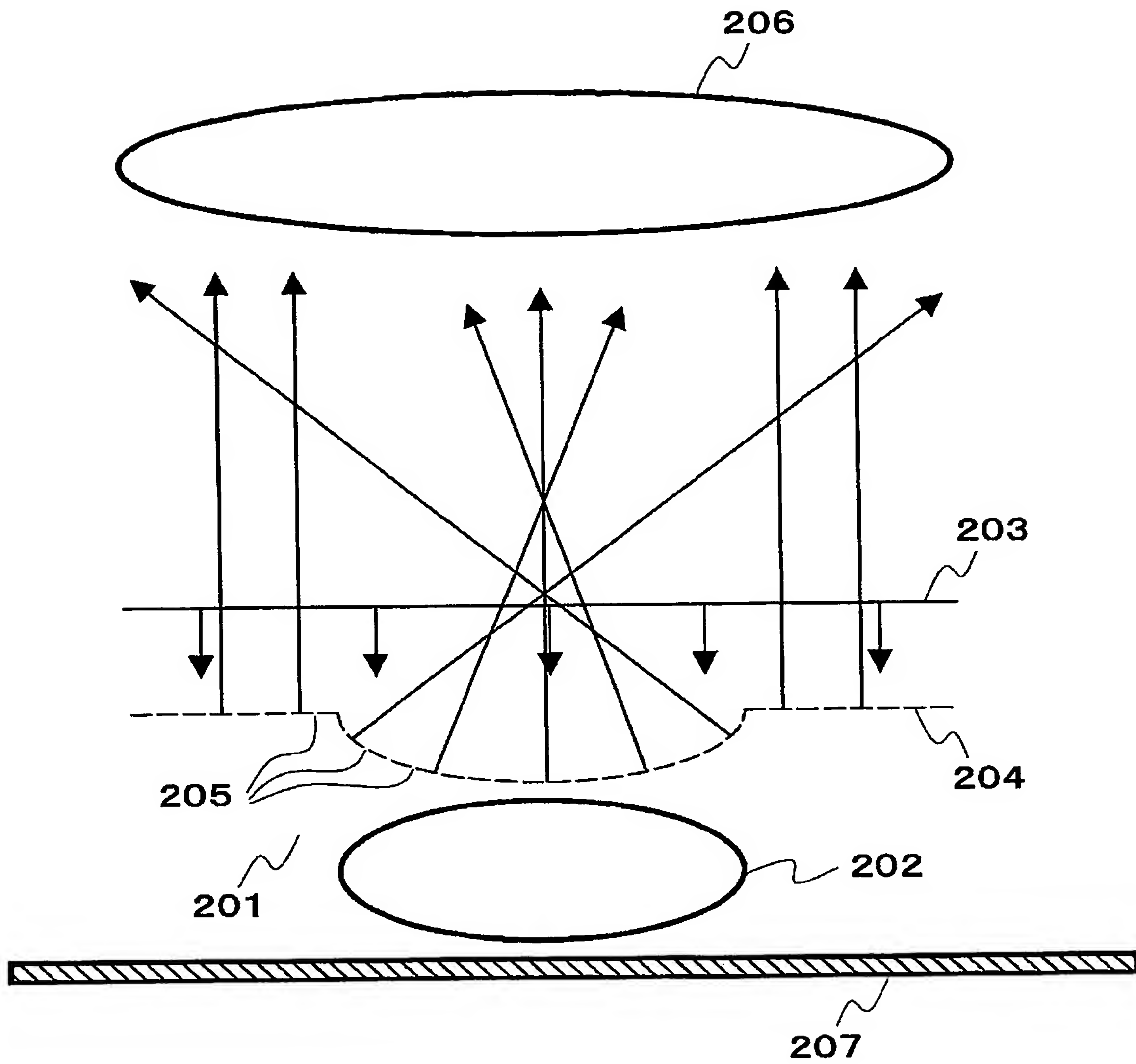
【図 9】

図 9



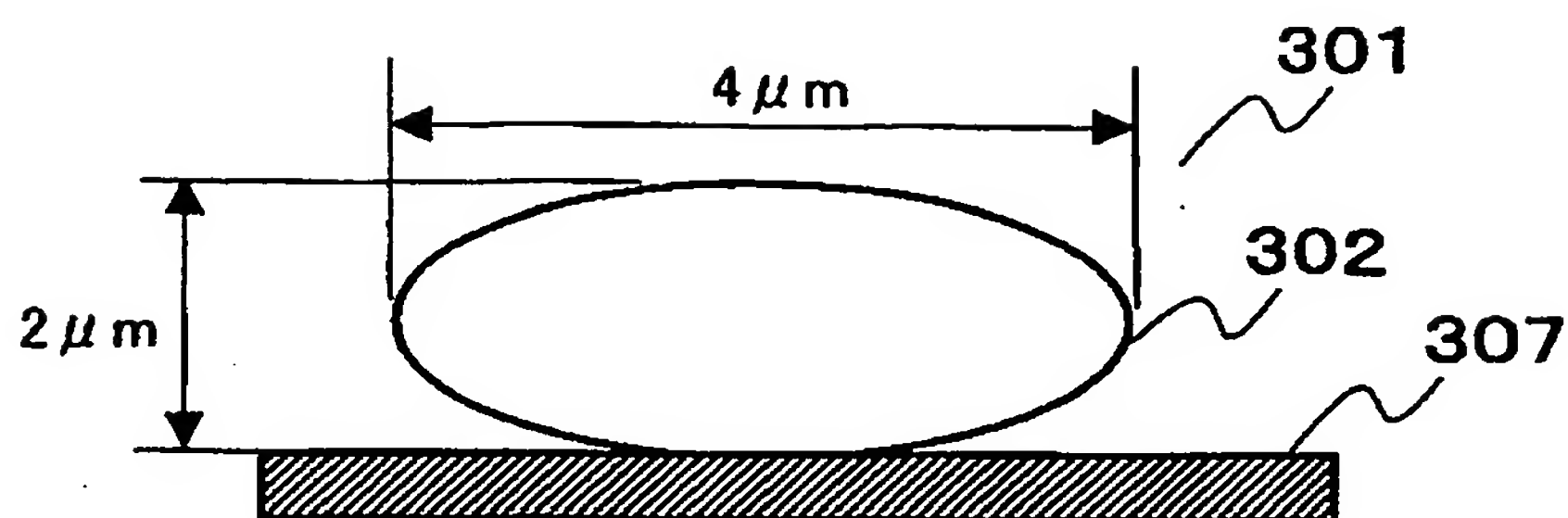
【図 10】

図10

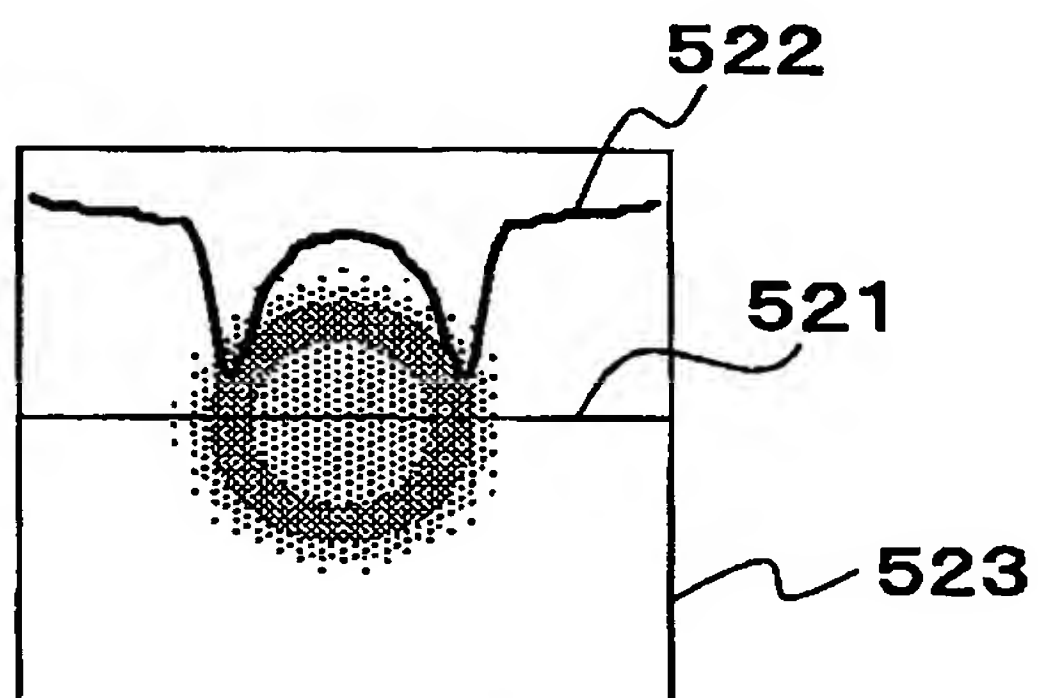


【図 11】

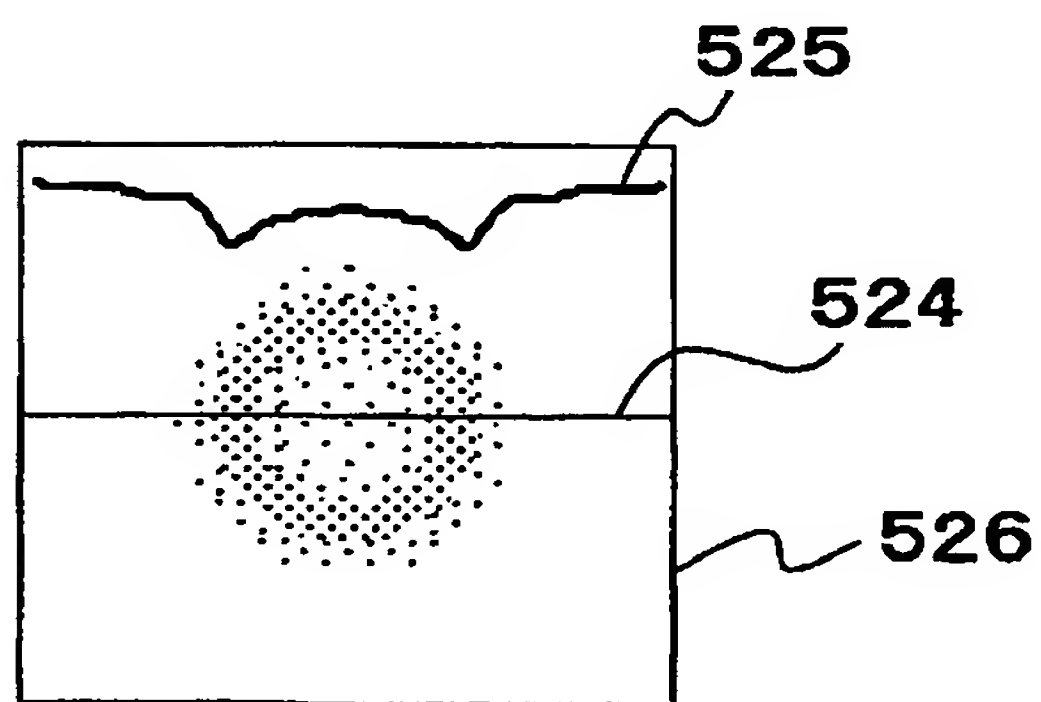
図 11



(a)

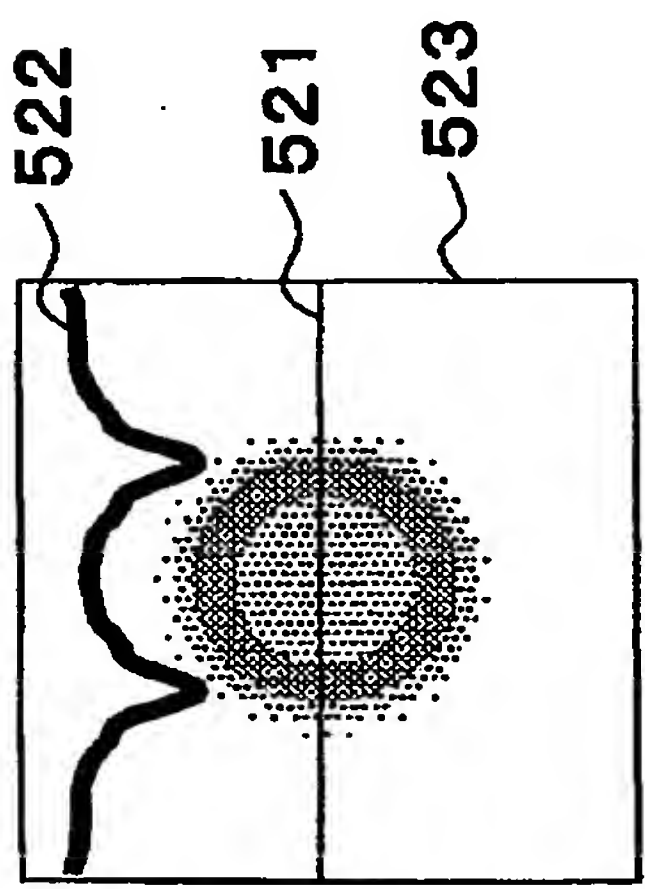
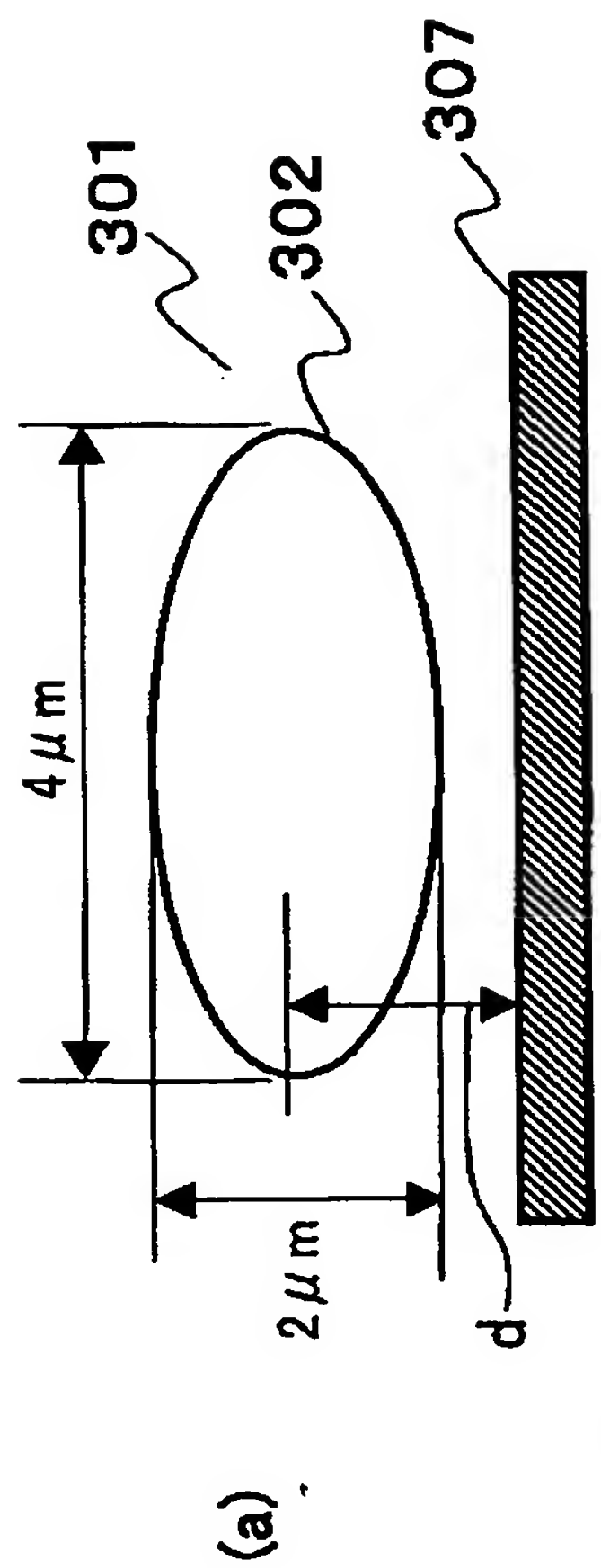


(b)

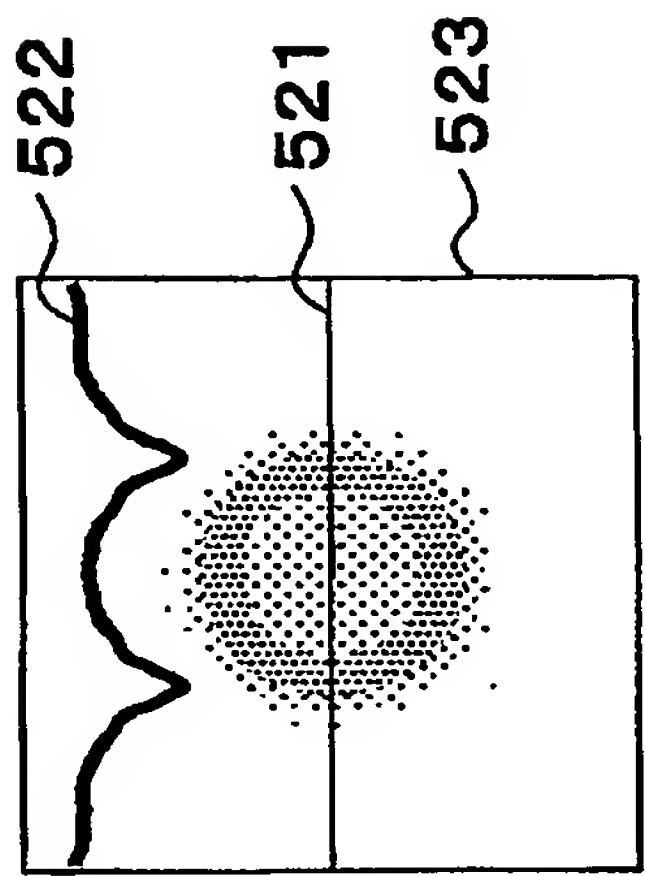


(c)

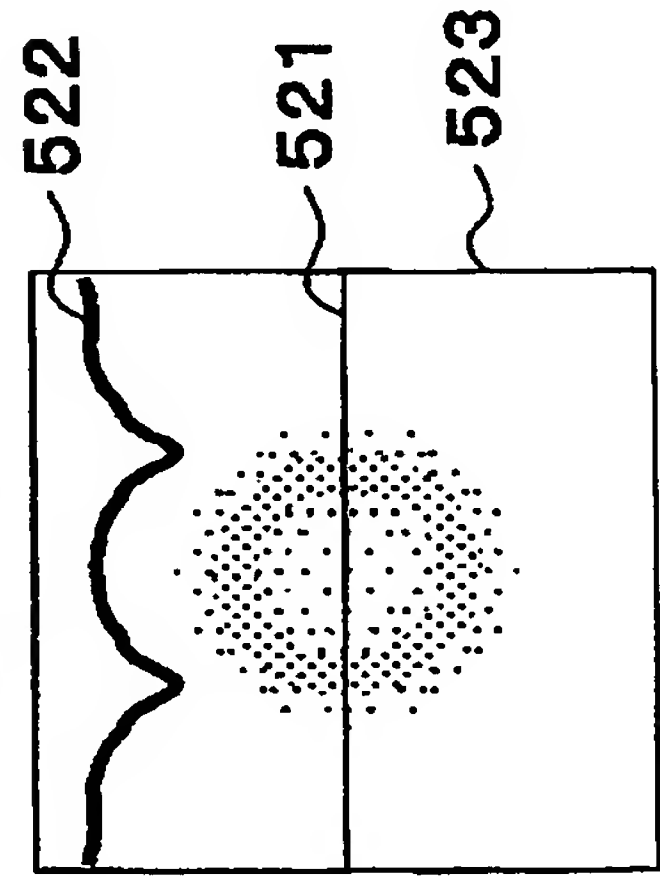
【図 12】



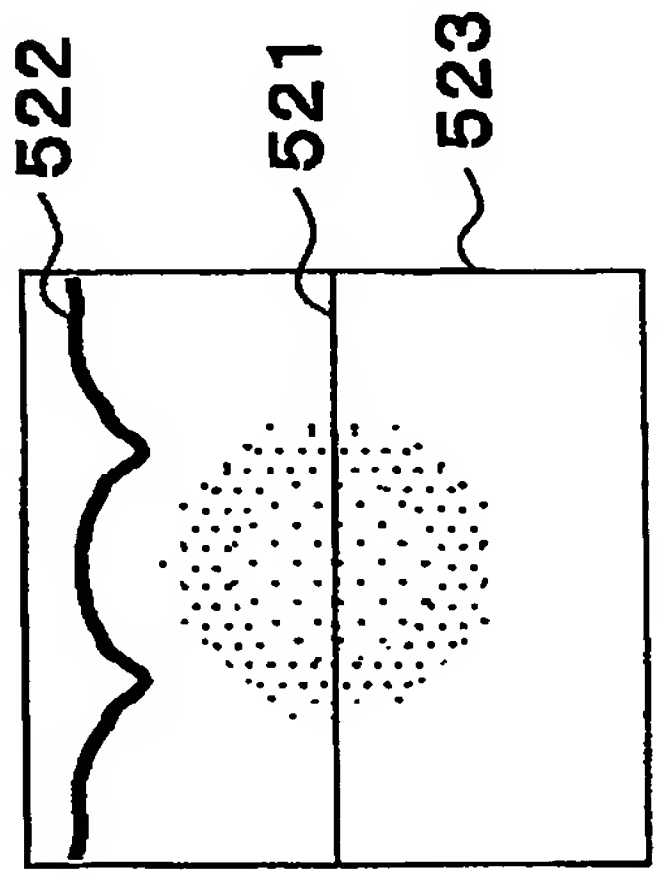
(b)



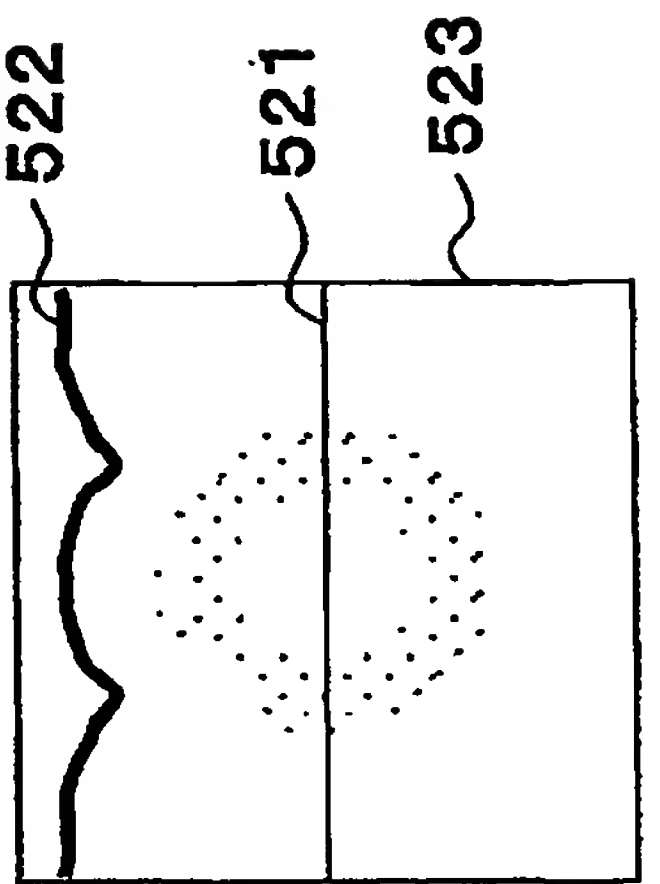
(c)



(d)



(e)

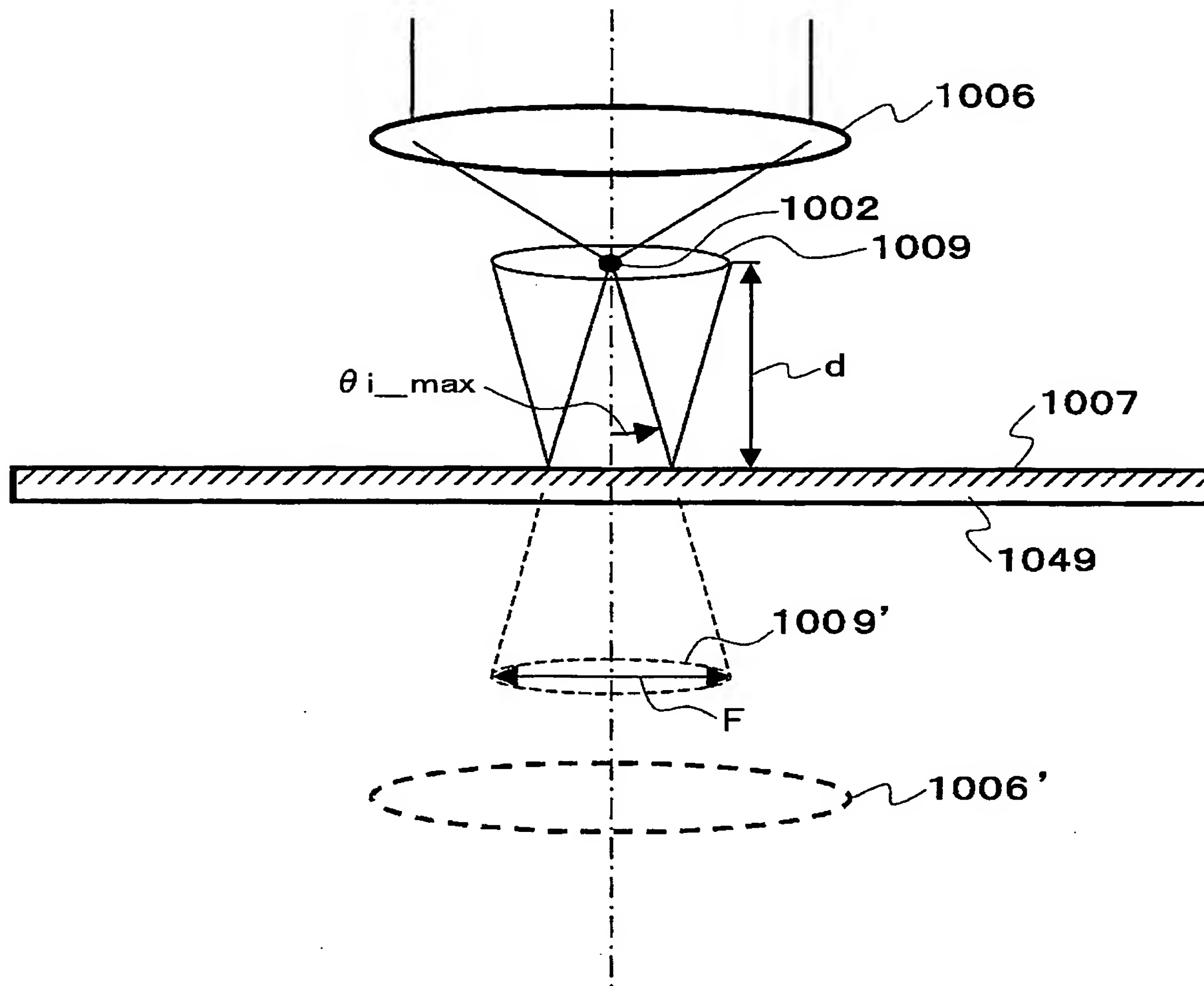


(f)

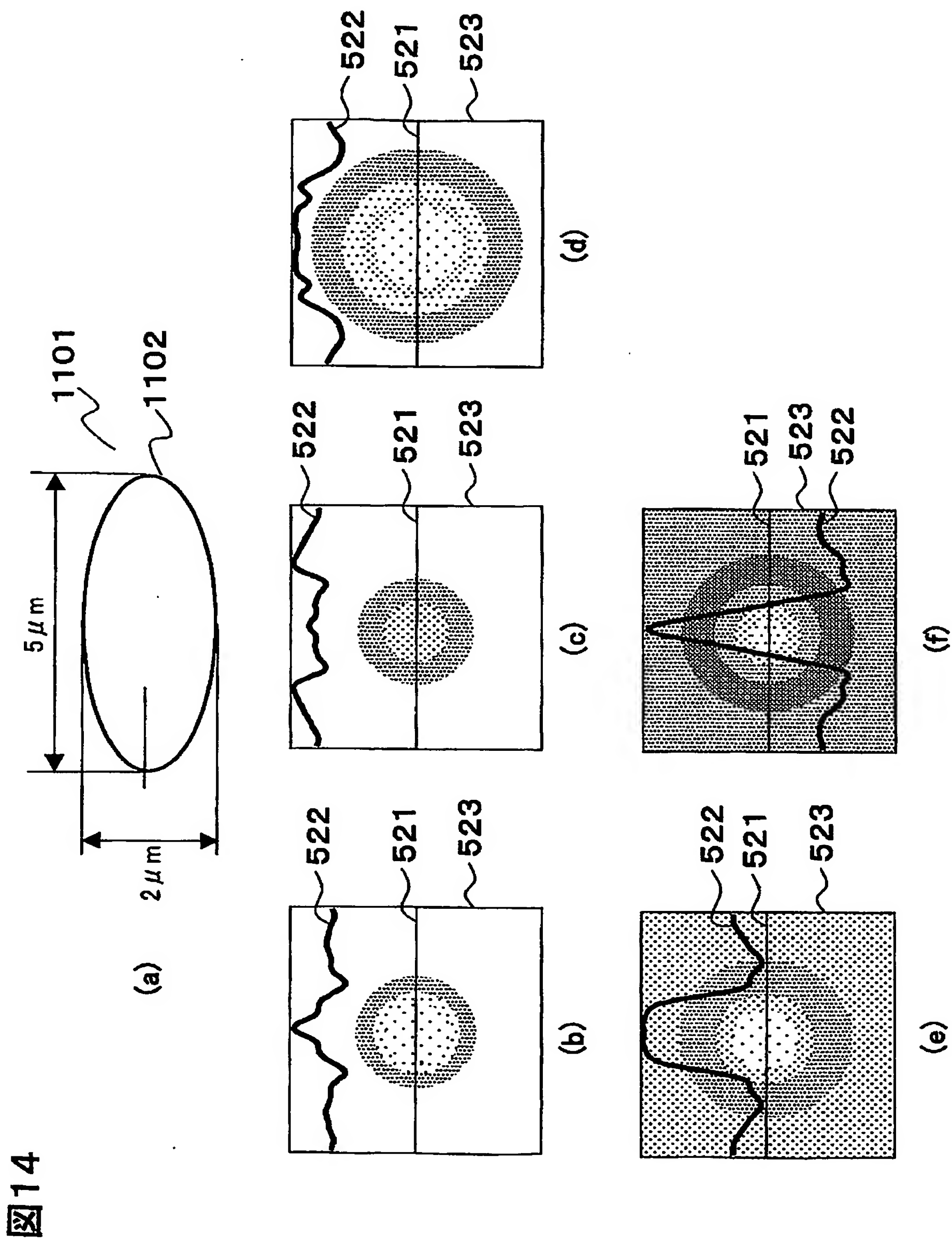
図12

【図 13】

図13

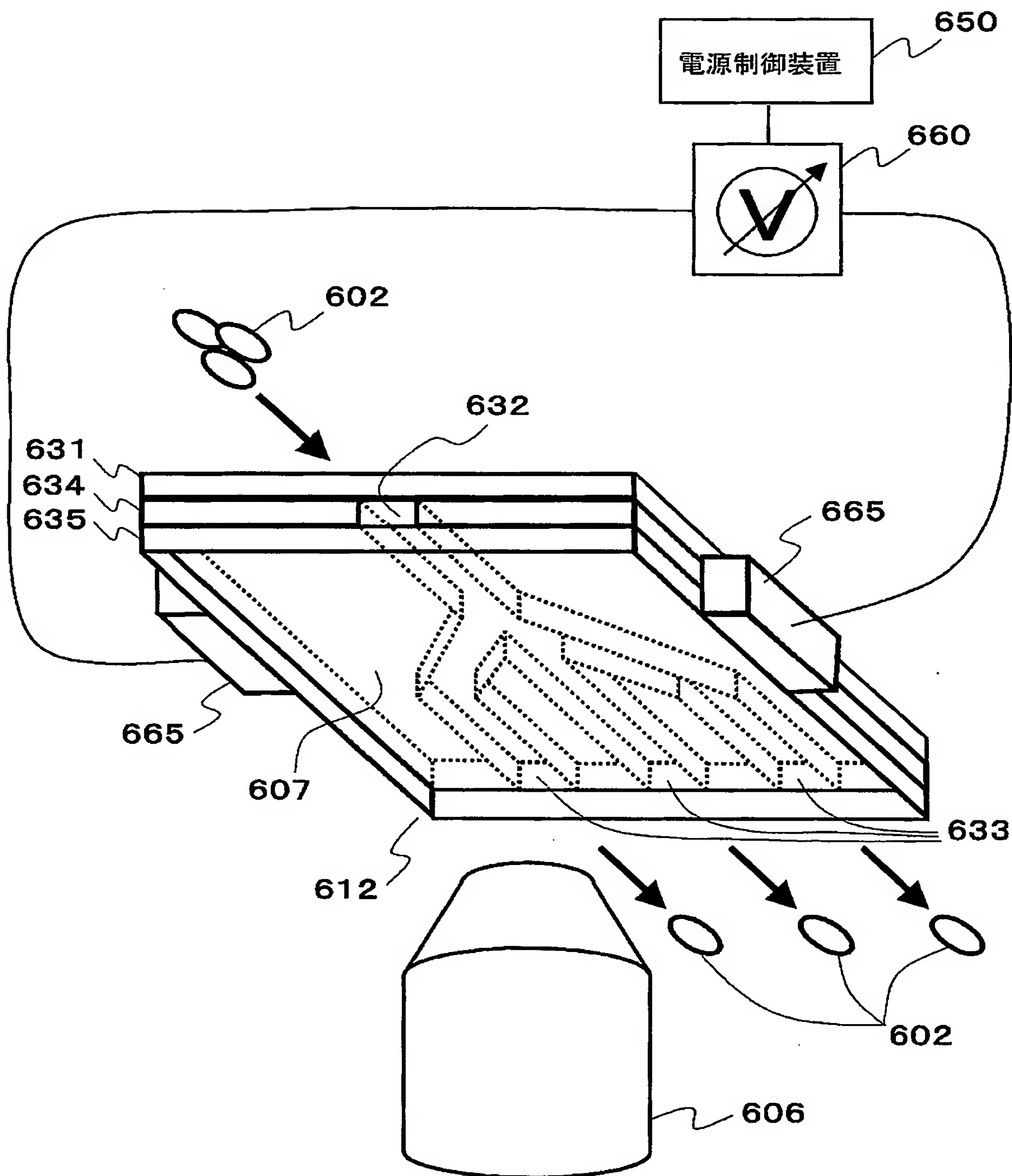


【図 14】



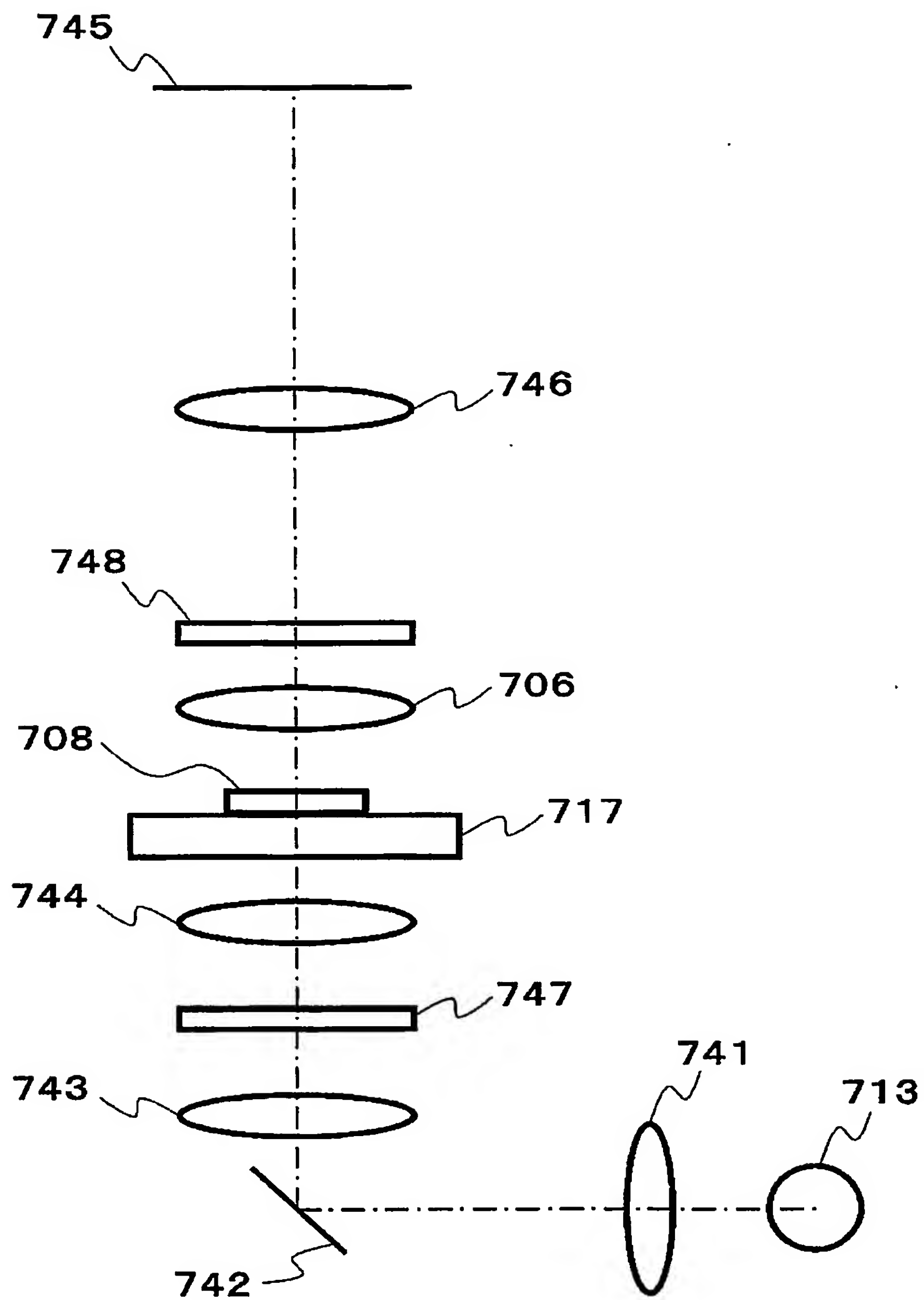
【図 15】

図 15



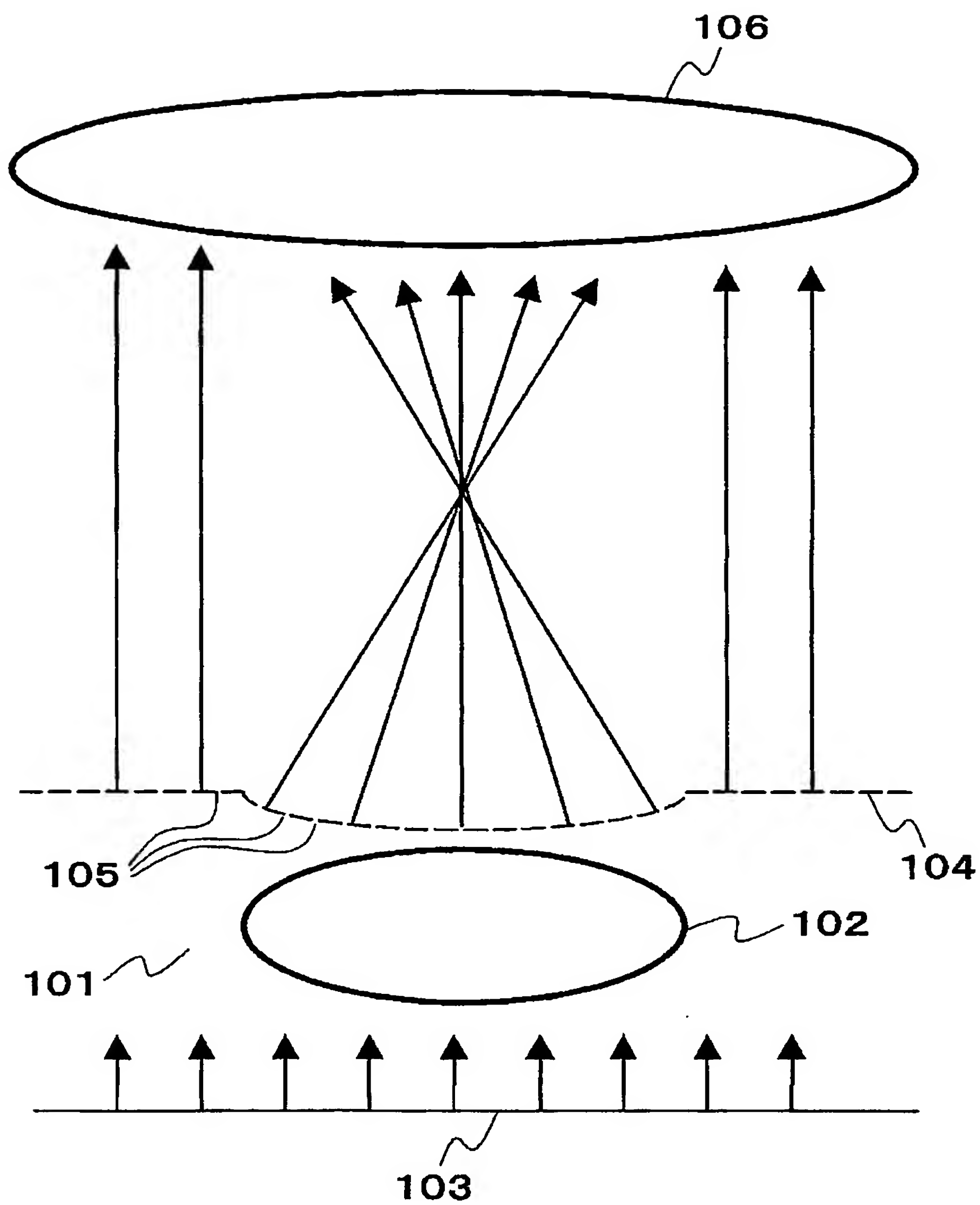
【図 16】

図 16



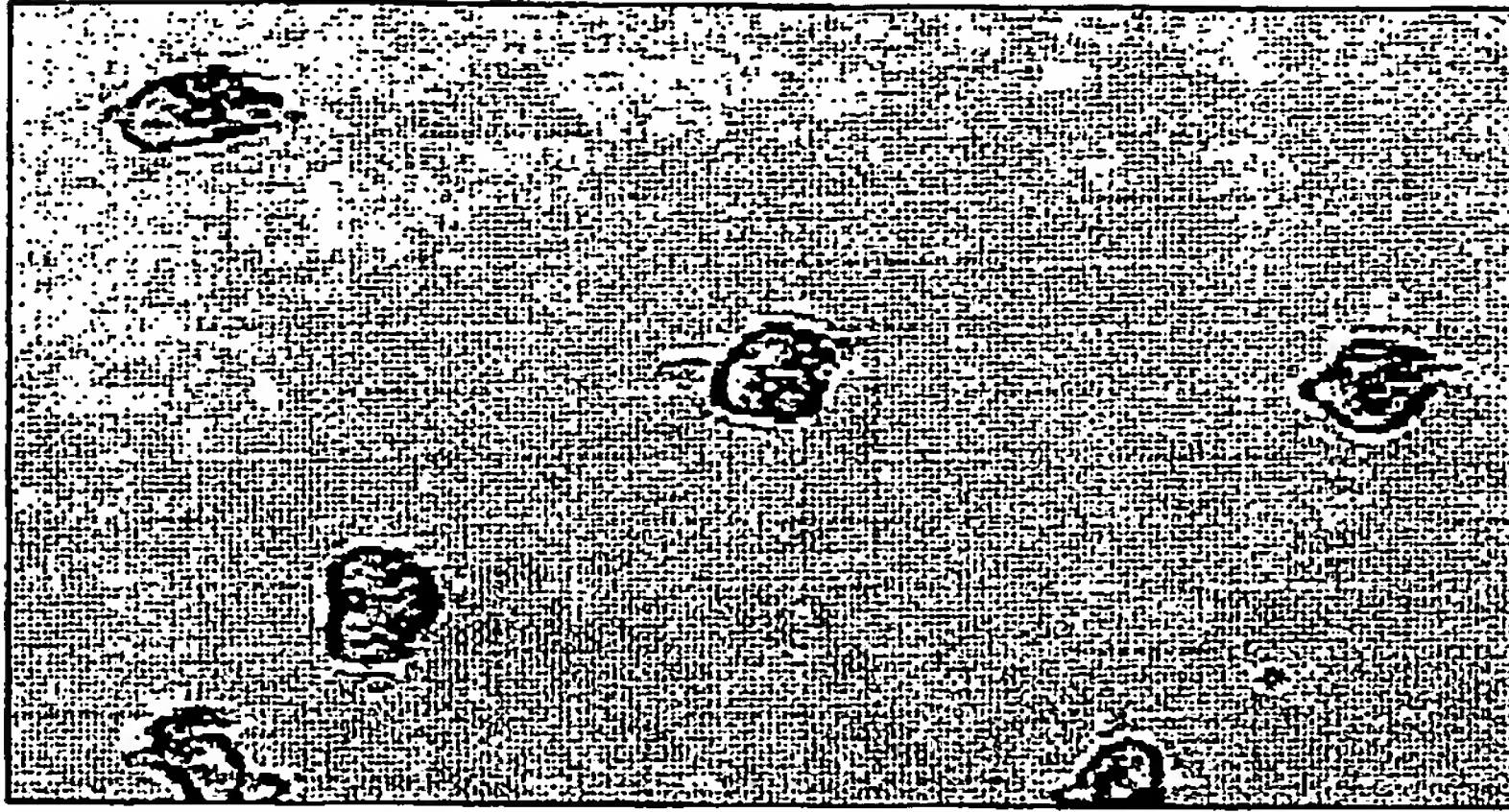
【図 17】

図 17



【図 18】

図18



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞等の透明な微小物体を、特殊観察法に必要とされるような特殊な変調素子を用いることなく、かつ簡便に観察する。

【解決手段】 対物レンズを有する光学系を介して落射照明光により照明して観察対象物を観察する観察方法において用いられる観察対象物収納用の観察器具であって、観察時に落射照明を反射する反射面を有する観察器具。反射面は、対物レンズに対向する面または対向する面の反対面に設けられている。観察器具には、液体を保持できる容器を有し、上記観察器具を用いて、細胞等を培養液とともに観察する。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 2 0 7 7 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 0 2 0 1 4 0 6]

1. 変更年月日 2 0 0 0 年 4 月 2 8 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都目黒区駒場 4 - 6 - 2 メゾン駒場 4 0 1 号
氏 名 株式会社 エフェクター細胞研究所
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 2 月 1 3 日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都目黒区駒場一丁目 3 3 番 8 号
氏 名 株式会社 エフェクター細胞研究所